

Die Rolle der Wnt/ β -Catenin- und Bmp-Signalgebung während der frühen Herzentwicklung in der Maus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

angefertigt von Dipl. Biol. Alexandra Klaus

geboren am 15. März 1979 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. W. Birchmeier
2. Prof. H. Saumweber
3. Prof. L. Thierfelder

Tag der mündlichen Prüfung:

01. Oktober 2008

Abstract-Deutsch

Das Herz ist das erste Organ, das sich während der Embryonalentwicklung bildet und durch die Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff für die Lebenserhaltung von Geweben und Organen verantwortlich ist. Die Herzentwicklung benötigt die koordinierte Rekrutierung von zwei Herzvorläufer-Populationen, dem ersten und zweiten Herzfeld, welche sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzellpopulation während der Gastrulation bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Bmp- und Wnt-Signalwege auf die frühe Herzentwicklung in Mäusen untersucht. Dafür wurden mit Hilfe der Cre/LoxP-Technik inaktivierende und aktivierende Mutationen im Bmp-Rezeptor Ia (BmpRIa) und im zentralen Modulator des Wnt-Signalweges, beta-Catenin, in Zellen des Mesoderms eingeführt, aus dem beide Herzfelder hervorgehen. Inaktivierende Mutationen im BmpRIa führen zum Verlust von erster Herzfeldderivate und zum Expressionsverlust von Genen, welche für die Aufrechterhaltung und Spezialisierung des ersten Herzfeldes in den späteren linken Ventrikel wichtig sind. In Mäusen mit inaktivierenden Mutationen in beta-Catenin bildet sich das erste Herzfeld korrekt, während die Entwicklung des zweiten Herzfeldes, z.B. die rechtsgerichtete Windung des linearen Herzrohres sowie Bildung des Ausflusstrakts und rechten Ventrikels, gestört ist. Die Genexpression von Bmp4 und Islet1 in Vorläufern des zweiten Herzfeldes ist stark reduziert, während aktivierende Mutationen in beta-Catenin diese verstärken und die Bildung des linearen Herzrohres stören. Diese Ergebnisse zeigen, dass beta-Catenin für die Entwicklung des zweiten Herzfeldes entscheidend ist, und dass die Aktivierung des Wnt/beta-Catenin-Signalweges zeitlich und räumlich präzise reguliert werden muss, damit sich ein windendes lineares Herzrohr entwickeln kann. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die BmpRIa- und Wnt/beta-Catenin-Signalwege unterschiedliche Rollen während der Musterbildung in der frühen Herzentwicklung spielen.

beta catenin

Bmp Rezeptor Ia

Signalgebung

Herzentwicklung

Maus

Herzfeld

Abstract-Englisch

The vertebrate heart is the first organ that forms during embryonic development. Heart formation requires the coordinated recruitment of multiple cardiac progenitor cell populations derived from both the first and second heart fields, which arise from a common progenitor at gastrulation. In this study we have ablated the Bmp receptor 1a (BmpR1a) and the Wnt effector beta-Catenin in the developing heart of mice using MesP1-cre, which acts in early mesoderm progenitors that contribute to both first and second heart fields. Remarkably, the entire cardiac crescent and later the primitive ventricle were absent in MesP1-cre; BmpR1a loss-of-function mutants. While myocardial progenitor and differentiation markers were detected in the small, remaining cardiac field in these mutants, first heart field markers, which are required for the maintenance and specification of first heart field derivatives, were not expressed. We conclude from these results that Bmp receptor signaling is crucial for the specification of the first heart field. In MesP1-cre; beta-Catenin loss-of-function mutants, cardiac crescent formation as well as first heart field markers were not affected, although cardiac looping and right ventricle formation were blocked. Expression of Isl1 and Bmp4 in second heart field progenitors was strongly reduced. In contrast, in gain-of-function mutation of beta-Catenin using MesP1-cre we revealed an expansion of Isl1 and Bmp4 expressing cells, although the heart tube was not formed. We conclude from these results that Wnt/beta-Catenin signaling regulates second heart field development, and that a precise amount and/or timing of Wnt/beta-Catenin signaling is required for proper heart tube formation and cardiac looping. In conclusion, we have shown that Bmp and canonical Wnt signaling have distinct roles during early cardiogenesis in mice.

beta catenin

Bmp receptor 1a

Signaling

Cardiogenesis

Mouse

Heart field

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt.

Zusammenfassung

Durch zeitliche und räumliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen (z.B. Wnt, Tgf- β /Bmp, Notch, Hedgehog und Rezeptortyrosinkinasen) wird die reguläre Embryonalentwicklung von Organismen ermöglicht. Störungen in der Signalübertragung können zu Defekten während der Embryonalentwicklung führen, aber auch die Entstehung und Progression von Krankheiten und Tumoren fördern. Das Herz ist das erste Organ, welches sich während der Embryonalentwicklung von Vertebraten bildet und durch die Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff für die Lebenserhaltung von Geweben und Organen innerhalb des gesamten Organismus verantwortlich ist. Störungen in der Herzentwicklung (in Formbildung, Wachstum, Kontraktilität, Gefäßbildung) gehören zu den weltweit häufigsten Geburtsdefekten. Der Zeitpunkt der Fehlbildung während der Embryonalentwicklung bestimmt den Schweregrad der Störung, vom Tod während der Embryonalentwicklung bis zu embryonalen Defekten, die erst im Alter zu Beeinträchtigungen führen. Um die Entwicklung des Herzens und herzassoziierter Krankheiten besser zu verstehen und gezielte Therapien durchführen zu können, ist es von großer Bedeutung, Komponenten der extra- und intrazellulären Signalübertragung und deren transkriptionelle Regulierung und Wechselwirkung mit anderen Signalwegen zu entschlüsseln.

Die Herzentwicklung benötigt die koordinierte Rekrutierung von zwei Herzvorläufer-Populationen, dem ersten und zweiten Herzfeld, welche sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzellpopulation während der Gastrulation bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Bmp- und Wnt- Signaltransduktionswege auf die frühe Herzentwicklung in Mäusen untersucht. Dafür wurden mit Hilfe der Cre/LoxP-Technik inaktivierende und aktivierende Mutationen im Bmp-Rezeptor Ia (BmpRIa) und im zentralen Modulator des Wnt-Signalweges, β -Catenin, in Zellen des anterioren Mesoderms eingeführt, aus welchen beide Herzfelder gebildet werden. Inaktivierende Mutationen im BmpRIa führen zum Verlust von Derivaten des ersten Herzfeldes und zum Expressionsverlust von Genen, welche für die Aufrechterhaltung und Spezialisierung des ersten Herzfeldes in den späteren linken Ventrikel wichtig sind. In Mäusen mit inaktivierenden Mutationen in β -Catenin bildet sich das erste Herzfeld korrekt, während die Entwicklung des zweiten Herzfeldes, z.B. die rechtsgerichtete Windung des linearen Herzrohres sowie Bildung des Ausflusstrakts und rechten Ventrikels, gestört ist. Die Genexpression von *Bmp4* und *Islet1* in Vorläufern des zweiten Herzfeldes ist stark reduziert, während aktivierende Mutationen in β -Catenin diese verstärken und die Bildung des linearen Herzrohres stören. Diese Ergebnisse zeigen, dass β -Catenin für die Entwicklung des zweiten Herzfeldes entscheidend ist, und dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zeitlich und räumlich präzise reguliert werden muss, damit sich ein rechtsgewundenes lineares Herzrohr entwickeln kann. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die BmpRIa- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege unterschiedliche Rollen während der Musterbildung in der frühen Herzentwicklung spielen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract-Deutsch	6
Abstract-Englisch	7
Zusammenfassung	9
Inhaltsverzeichnis	10
Einleitung.....	12
Der Wnt-Signaltransduktionsweg.....	12
<i>Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg</i>	<i>14</i>
<i>Der Einfluss des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweges auf die murine Embryonalentwicklung</i>	<i>16</i>
Der Tgf- β / Bmp-Signaltransduktionsweg	19
<i>Der Bmp-Signaltransduktionsweg.....</i>	<i>20</i>
<i>Der Einfluss des Bmp-Signalweges auf die murine Embryonalentwicklung</i>	<i>22</i>
Die embryonale Herzentwicklung in Säugern	24
Die Rolle von Genexpression und Signalgebung in der Herzentwicklung	27
<i>Der Einfluss der Bmp-Signalgebung auf die Herzentwicklung.....</i>	<i>28</i>
<i>Der Einfluss der Wnt/β-Catenin-Signalgebung auf die Herzentwicklung</i>	<i>29</i>
Zielstellung dieser Arbeit.....	32
Ergebnisse.....	34
Aktivierung der Wnt/ β -Catenin und Bmp-Signalwege im ersten und zweiten Herzfeld.....	34
Generierung von β -Catenin- und BmpR1a-defizienten Mäusen, die sich phänotypisch in Herzvorläuferzellen ausprägen	36
Der Verlust der BmpR1a-Signalgebung verhindert die Bildung des ersten Herzfeldes	39
Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg kontrolliert die Entwicklung des zweiten Herzfeldes.....	41
<i>Der Verlust von β-Catenin in mesodermalen Herzvorläuferzellen verhindert die Windung des Herzens.....</i>	<i>43</i>
<i>Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges verhindert die Bildung des Herzrohres</i>	<i>49</i>

<i>Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg kontrolliert die Expression von Bmp4 im sekundären Herzfeld</i>	<i>50</i>
Diskussion	55
Die Bmp- und Wnt-Signalwege sind essentiell für die Bildung früh-embryonaler Herzstrukturen.....	55
Die Rolle der BmpRla-Signalgebung in der Spezifizierung des ersten Herzfeldes.....	56
Die Rolle der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung in der Entwicklung des zweiten Herzfeldes..	60
Die verschiedenen Phasen des kanonischen Wnt-Signalweges während der embryonalen Herzentwicklung.....	63
Wechselwirkung der Wnt/ β -Catenin- und BmpRla-Signalwege mit dem transkriptionellen Netzwerk während der frühen Herzentwicklung.....	67
Materialien und Methoden	73
Materialien und molekularbiologische Standardmethoden	73
<i>Verwendete Reagenzien und Chemikalien</i>	<i>73</i>
<i>Verwendete Geräte</i>	<i>73</i>
<i>Bakterienstamm</i>	<i>73</i>
<i>Antikörper und cDNAs.....</i>	<i>73</i>
<i>Standardmethoden und Kits.....</i>	<i>74</i>
Verwendete Mauslinien und deren Genotypisierung	74
Immunhistochemie	75
<i>Histologische Färbungen von Embryonenschnitten.....</i>	<i>76</i>
<i>Immunfluoreszenz- und TUNEL- Färbung auf gefrorenen Embryonenschnitten</i>	<i>77</i>
<i>In-Situ-Hybridisierung am ganzen Embryo</i>	<i>78</i>
<i>β-Galaktosidasefärbung am ganzen Embryo.....</i>	<i>80</i>
Abkürzungsverzeichnis	81
Literaturverzeichnis	83
Erklärung	109
Publikationsliste.....	109

Einleitung

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus aus einer einzigen Zelle, die Entstehung von Mehrschichtigkeit, Differenzierung und die Determination von Zellen und Zellgruppen wird durch die Vernetzung von Signalwegen (z.B. Wnt, Tgf- β / Bmp, Notch, Hedgehog und Rezeptortyrosinkinasen) ermöglicht. Diese Signaltransduktionswege werden durch spezifische extrazelluläre Signale, über deren Bindung an membranständige Rezeptoren, initiiert. Das Signal wird in das Innere der Zelle weitergeleitet und kann über intrazelluläre Komponenten im Signalweg potenziert werden. Einzelne Signalwege können miteinander kommunizieren und sich gegenseitig regulatorisch beeinflussen. Die räumliche und zeitliche Integration dieser komplex vernetzten Signalwege ist für die normale Embryonalentwicklung essentiell. Um die Embryonalentwicklung, im Speziellen die Herzentwicklung, besser verstehen zu können ist es von großer Bedeutung die Regulation herzspezifischer Zielgene und die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Signalwegen zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten zu entschlüsseln.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg

Der Wnt-Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung sowie Regeneration von Organen und Geweben im adulten Organismus. Störungen in der Signalübertragung führen zur Entstehung von Krankheiten und Progression von Tumoren. Erste direkte Hinweise auf die Rolle des Wnt-Signalweges lieferten Studien in *Drosophila* und in der Maus. In der Maus wurde 1982 erstmalig ein Gen identifiziert, *Int-1*, welches durch die Integration eines Retrovirus aktiviert wird und in Mäusen Brustkrebs induziert¹. Eine *Drosophila*-Mutante mit schweren embryonalen Störungen in der Flügelentwicklung wurde bereits 1973 beschrieben und erhielt den Namen *Wingless (wg)*², welches sich später als *Int-1*- Homolog herausstellte^{3;4}. Die Abkürzung Wnt steht seither für eine Kombination aus den Gennamen Wingless aus *Drosophila* und Int-1 aus der Maus⁵. Neben dem Verlust der Flügel zeigte die *wg*-Mutante Segmentierungsstörungen während der Embryonalentwicklung⁶. Diese und weitere Mutanten mit Segmentierungsstörungen, sogenannte Segmentpolaritätsgene, wurden in Reihenuntersuchungen von Nüsslein-Volhard, Wieschaus und Anderen entdeckt und

charakterisiert⁶⁻⁹. Einige dieser Mutanten wiesen Mutationen in Genen auf, die wenig später als Komponenten der Wnt-Signaltransduktion identifiziert wurden.

Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts gab es indirekte Hinweise auf die Rolle des Wnt-Signalweges in der Entwicklung der embryonalen Körperachse. So zeigten schon Spemann und Mangold 1924, dass die Transplantation der dorsalen Urdarmmundlippe eines gastrulierenden Molchkeimes auf die Ventralseite eines anderen eine zweite Körperachse induzieren kann¹⁰. Eine zweite Körperachse in Froschembryonen konnte Morgan bereits 1902 mittels Lithiumchlorid erzeugen¹¹. Die Entwicklung der zweiten Körperachse in Xenopusembryonen durch Transplantation, Lithiumchlorid oder Injektion von In-Vitro-synthetisierter Wnt-1 mRNA wurde Ende des 19. Jahrhunderts auf die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges in Zellen zurückgeführt, welche während der normalen Embryonalentwicklung keine Wnt-Aktivität zeigen¹²⁻¹⁴.

Wnt-Proteine gehören zur Familie der cysteinreichen Glykoproteine, welche lokal auf benachbarte Zellen (parakrin) übertragen werden¹⁵. Die Reifung und Sezernierung von Wnt-Proteinen erfolgt durch schrittweise Modifizierung und Transport innerhalb benachbarter Zellen: Palmitoylierung und Glykosylierung durch Porcupine, Transport und Sezernierung modifizierter Wnt-Proteine vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran über Wntless, und Recycling von Wntless durch den Retromer-Komplex¹⁶⁻²⁵. Sezernierte Wnt-Proteine können als Liganden an die extrazelluläre N-terminale Domäne von Frizzled (Frz)-Siebentransmembran-Rezeptoren binden und die Signalweiterleitung im Zytoplasma einleiten²⁶⁻²⁸. Durch die Bindung von Wnt-Liganden an Frizzled-Rezeptoren wird die Aktivierung verschiedener Wnt-Signalwege initiiert. Es wird zwischen dem klassischen, kanonischen Wnt/ β -Catenin- und den nichtkanonischen planaren Zellpolaritäts- (Wnt/JNK-Signalweg) und Wnt/ Ca^{2+} -Signaltransduktionswegen unterschieden. Die Familie der Wnt-Proteine (es existieren 19 humane Wnt-Gene) kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Die ektopische Expression von z.B. Wnt-1, -3a, -6, -8a resultiert in der transformierenden, d.h. onkogenen Wirkung auf epitheliale Zellen sowie Induktion einer sekundären Körperachse in Xenopusembryonen, durch die vorwiegende Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Zur zweiten Gruppe gehören die nichtkanonischen Wnt-Liganden wie z.B. Wnt-4, -5a, -11, welche die Zellpolarität und gerichtete Zellbewegungen in Drosophila- und Xenopusembryonen kontrollieren, auch bekannt als Konvergenz- und Extensionsbewegungen^{29,30}.

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg

Im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg werden Wnt-Zielgene durch die Stabilisierung von β -Catenin und dessen Translokation in den Zellkern aktiviert (Abb.1). β -Catenin gehört zur Familie der Armadillo-Proteine (β -Catenin hat 12 Armadillo-Repeats) und besitzt eine duale Funktion in der Zelle, zum einen als Zelladhäsionsmolekül und zum anderen als zentrales Molekül im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg³¹⁻³⁷. Die Kontrolle der β -Catenin-Stabilität ist ausschlaggebend für die Wnt-Signaltransduktion³⁸⁻⁴⁰. In der Abwesenheit von Wnt-Liganden (Abb.1A) wird zytoplasmatisches β -Catenin in einen Multiproteinkomplex rekrutiert. β -Catenin interagiert in diesem Multiproteinkomplex mit dem Tumorsuppressorgenprodukt Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Axin1/Axin2 (Conductin) und wird durch zwei Kinasen, Caseinkinase 1 α (CK1 α) und Glykogensynthasekinase-3 β (Gsk-3 β), N-terminal phosphoryliert⁴¹⁻⁴⁸. Nach der N-terminalen Phosphorylierung (an Ser45, Thr41, Ser37 und Ser33) wird β -Catenin durch Bindung an β -TrCP in einem E3-Ubiquitin-Ligasenkomplex polyubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau vorbereitet⁴⁹⁻⁵². Durch den Abbau überschüssigen zytoplasmatischen β -Catenins wird der Gehalt an β -Catenin in der Zelle gering gehalten und dessen Translokation in den Zellkern verhindert. Im Zellkern wird die Transkription von LEF/TCF-Zielgenen durch die Interaktion von LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren mit Groucho-Ko-Repressoren verhindert⁵³⁻⁵⁵.

In Anwesenheit von kanonischen Wnt-Liganden bildet sich ein ternärer Komplex bestehend aus Wnt, Frizzled und einem Lipoprotein-verwandten-Ko-Rezeptor LRP5 oder LRP6⁵⁶⁻⁵⁸. Die Bindung von Wnt-Liganden an Frizzled- und LRP5/6-Rezeptoren kann durch verschiedene Inhibitoren unterbunden werden (s.Abb.1A). Zu diesen Inhibitoren gehören lösliche Frizzled-verwandte Moleküle (sFRPs) und der Wnt-inhibitorische-Faktor-1 (WIF), welche in der interstitiellen Flüssigkeit mit Wnt-Liganden interagieren können und somit mit Frizzled-Rezeptoren um deren Interaktion kompetieren⁵⁹⁻⁶¹. Die Sezernierung von Dickkopf-Molekülen (DKK) initiieren deren Bindung an Kremen und LRP5/6-Rezeptoren, so dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Internalisierung von LRP inhibiert werden kann^{62,63}. Durch die Bindung von kanonischen Wnt-Liganden an Frizzled- und LRP5/6-Ko-Rezeptoren wird zum einen LRP5/6 von CK1 γ und Gsk-3 β phosphoryliert^{64,65} (Abb.1B). Zum anderen wird die Rekrutierung von Dishevelled-Molekülen (Dvl) zur Plasmamembran und deren Interaktion mit Frizzled sowie

Polymerisierung mit anderen Dishevelled-Molekülen initiiert^{66;67}. Die Phosphorylierung von LRP5/6 und die Bildung des Dishevelled-Polymers leitet die Translokation von Axin zur Plasmamembran ein. Die Translokation von Axin zur Plasmamembran resultiert in der Aufhebung des Multiproteinabbaukomplexes und somit in der zytoplasmatischen Anreicherung und anschließenden Translokation von β -Catenin in den Zellkern⁶⁸. Im Zellkern bildet β -Catenin einen transkriptionell aktiven Komplex mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren, in welchem die Bindung von Groucho-Ko-Repressoren aufgehoben und die Bindung an Ko-Aktivatoren, wie BCL9, Pygo und CBP, initiiert wird^{35-37;69-75}.

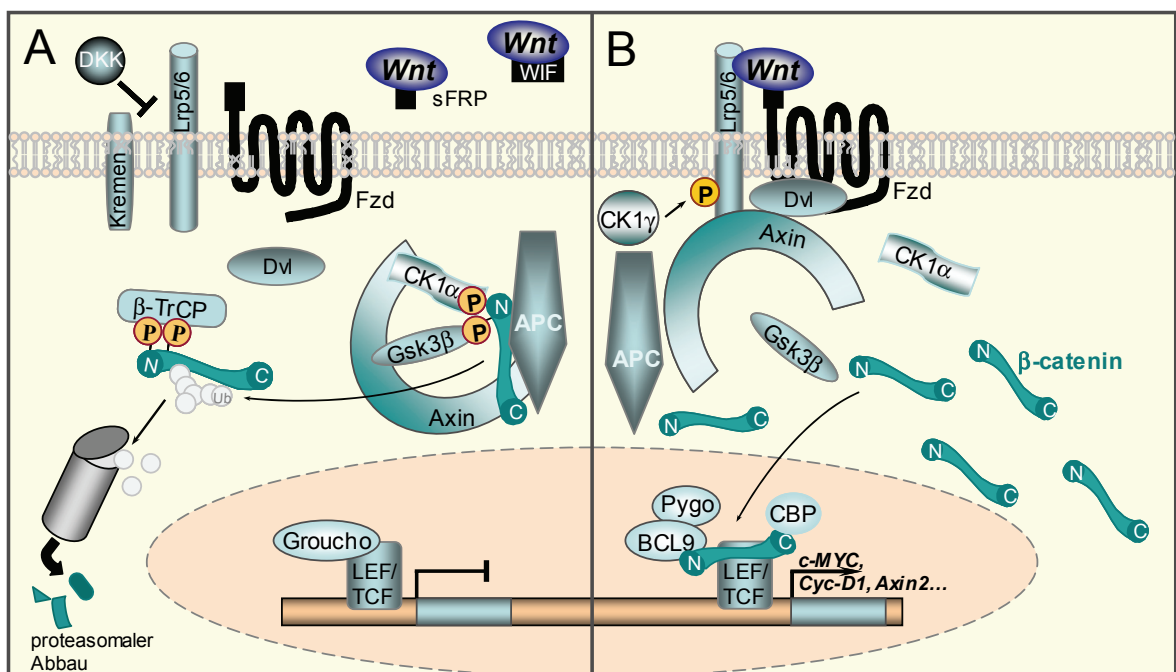


Abb. 1: Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg. (A) In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird zytoplasmatisches β-Catenin in einen Multiproteinkomplex, bestehend aus Axin/Conductin und APC, rekrutiert und durch CK1α und Gsk-3β N-terminal phosphoryliert. Die E3-Ubiquitinligase β-TrCP erkennt N-terminal phosphoryliertes β-Catenin, ist verantwortlich für dessen Ubiquitinierung und anschließenden proteasomalen Abbau. (B) Durch die Bindung von Wnt Liganden an Frizzled und Lrp5/6-Ko-Rezeptoren wird die Signalübertragung über β-Catenin induziert. Nach Bindung von Wnt-Liganden werden Lrp5/6 durch CK1γ und Gsk3β phosphoryliert und Dishevelled Moleküle bilden einen an Frizzled-gebundenen Polymer. Phosphorylierung und Polymerisierung führen zur Rekrutierung von Axin an die Plasmamembran und zur Inaktivierung des Multiproteinabbaukomplexes. Ungebundenes stabiles β-Catenin wird in den Zellkern transloziert und bildet einen transkriptionell aktiven Komplex mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren, indem die Bindung zu Ko-Inhibitor Groucho aufgehoben und die Bindung an Ko-Aktivatoren BCL9, Pygo und CBP initiiert wird. APC, adenomatous polyposis coli; β-TrCP, β-transducin repeat-containing protein; BCL9, B-cell lymphoma 9; CBP, CREB binding protein; CK1α/γ, Casein kinase 1α/γ; DKK, Dickkopf; Dvl, Dishevelled; Gsk-3β, Glykogen synthase kinase 3β; Fzd, Frizzled; LEF, lymphoid enhancer factor; LRP5/6, LDL-receptor related protein 5/6; sFRP, secreted Frizzled related protein; TCF, T-cell factor; P, Phosphorylierung; Pygo, Pygopus; Ub, Ubiquitin; WIF, Wnt inhibitory factor.

Es existieren zahlreiche Gene, deren Transkription durch den β -Catenin/LEF/TCF-Komplex angeschaltet wird. Als erstes direktes transkriptionelles β -Catenin/LEF-Zielgen wurde Ubx in Drosophila identifiziert, gefolgt von dem Protoonkogen c-Myc, welches erstmalig die direkte transformierende Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges in der Entstehung von Dickdarmkrebs zeigte^{76;77}. Die zurzeit beschriebenen direkten Wnt/ β -Catenin-Zielgene haben Funktionen in der Zelldifferenzierung (Siamois, Brachyury), Signaltransduktion (VEGF, Fgf4/18), Zellproliferation (c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D2), Zelladhäsion (E-Cadherin, Nr-Cam) und viele andere Gene, welche Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges sind und damit die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges positiv oder negativ autoregulieren (Frizzled, DKK, LRP5, Axin2, β -TrCP, LEF/TCFs). Eine ständig aktualisierte Übersicht über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und dessen direkten Zielgene bietet die Internetseite <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>.

Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf die murine Embryonalentwicklung

In Vertebraten beeinflusst der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg die Embryonalentwicklung aller Organe und Gewebe zu unterschiedlichsten Zeitpunkten, in Serie oder parallel mit den weiteren Signalwegen. Bereits vor Beginn der Gastrulation (Bildung der drei Keimblätter, aus welchen sich alle embryonalen Organe und Gewebe entwickeln) ist die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges entscheidend für die Festlegung der Antero/Posteriorachse und Mesoderminduktion. So führt der konventionelle Verlust von β -Catenin zu Veränderungen in der Entwicklung der extraembryonalen Zellschicht (primitives Endoderm), welche das embryonale Ektoderm (Epiblast) nach Einpflanzung der Blastozyste und vor Beginn der Gastrulation umschließt⁷⁸⁻⁸⁰. Es konnte gezeigt werden, dass β -Catenin im Epiblast die Migration von distalem primitivem Endoderm nach anterior und so die zukünftige Kopfregion festlegt^{79;80}. Die Migration des distalen primitiven Endoderms nach anterior wird dabei durch die entgegengesetzt gerichtete Expression von anteriorem Dkk1-Inhibitor und posteriorem Wnt-3a-Liganden kontrolliert⁸¹. Der konventionelle Verlust von kanonischem Wnt-3-Liganden, LRP5/6 in Kombination oder Mesd-Chaperonen (wichtig für LRP5/6-Membranlokation) zeigt hingegen die korrekte Formierung von anteriorem primitivem Endoderm, führt jedoch zum Verlust der Primitivleiste und sich daraus entwickelndem Mesoderm⁸²⁻⁸⁴. Im Gegensatz dazu wurden

durch die konditionelle Stabilisierung von β -Catenin in der Zygote sowie in homozygoten APC^{min}-Mutanten vorzeitig mesodermale Gene, wie Brachyury, im gesamten Epiblast angeschaltet^{85;86}.

Eine entscheidende Rolle wird der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung in der Polarisierung der Körperachsen, bezogen auf den gesamten Embryo aber auch bezogen auf die Entwicklung der einzelnen Organe und Gewebe, zu Teil. Zumeist bilden kanonische Wnt-Signale in posterioren oder proximalen Körperregionen einen Morphogen-Gradienten nach anterior oder distal. Ein proximo/distaler Gradient von Wnt-Morphogen ist in sich verzweigenden Organen zu finden, wie z.B. in Lunge, Brustdrüse und Niere⁸⁷⁻⁹⁴. Ein Gradient der Wnt-Signalgebung von posterior nach anterior zeigt sich hingegen während der Hirnentwicklung, Festlegung von Körpersegmenten und im Gastrointestinaltrakt⁹⁴⁻⁹⁸. Nullmutationen in Dkk1-Inhibitor und Überexpression von Wnt8c führen z.B. zum Verlust von Vorder- und Zwischenhirn, während Nullmutationen in Wnt-1, LRP6 oder Frizzled-4 Defekte in Zwischen- und Endhirn sowie Cerebellum auslösen^{56;99-103}. Der Einfluss der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung auf die dorso/ventrale und proximo/distale Körperachse lässt sich am Beispiel der Gliedmaßenentwicklung erklären. Die Gliedmaßen entwickeln sich aus einem mesodermalen kompakten Zellaggregat, welches von einer ektodermalen Zellschicht überlagert ist. An der Mittellinie zwischen dorsalem und ventralem Ektoderm (Dorso/Ventralachse) formt sich eine hervorstehende epitheliale Leiste (AER, Apical Ectodermal Ridge), von welcher Wnt-, Fgf- und Bmp-Signale in das darunter liegende Mesoderm sezerniert werden und das proximo/distale Auswachsen der Gliedmaßenknospe induzieren^{104;105}. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von β -Catenin im Ektoderm, welches das mesodermale Zellaggregat der zukünftigen Hintergliedmaßen überlagert, in schweren Fällen zum vollständigen Verlust der Hinterbeine führt. Der Verlust distaler Gliedmaßen konnte auf den Verlust der AER-Bildung und *Bmp2*-, *Bmp4*- und *Fgf8*-Expression zurückgeführt werden¹⁰⁵. In schwächeren Mutanten wurde der Verlust der Fußsohlen und stattdessen die Dorsalisierung der Ventralseite, z.B. Nagelbildung, detektiert^{105;106}. Ein äußeres Erscheinungsbild, welches mit dem konditioneller BmpRIa-Mutanten vergleichbar war¹⁰⁷. Die genaue Analyse der konditionellen stabilisierenden β -Catenin-Mutanten in Kombination mit konditionellen BmpRIa-Mutanten konnte zeigen, dass der BmpRIa-Signalweg den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Bildung des AER reguliert, d.h. Defekte von BmpRIa-Mutanten können durch Stabilisierung von β -Catenin

kompensiert werden. Im Gegensatz dazu konnten Defekte der Dorso/Ventralachse in BmpRIa-Mutanten nicht durch die Stabilisierung von β -Catenin ausgeglichen werden. Für die Ventralisierung scheinen Wnt/ β -Catenin-Signale und die BmpRIa-Signalgebung daher entweder gleichzeitig aktiviert zu sein oder der BmpRIa-Signalweg vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg kontrolliert zu werden¹⁰⁵.

Es existieren Organe, in welchen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg zeitlich alternierend (oszillierend) aktiviert und reprimiert wird, um z.B. die Bildung der paarigen Körpersegmente (Somiten) oder auch den Haarzyklus in der Haut zu kontrollieren. Die Segmentierung von Somitenpaaren wird durch die zeitlich entgegengesetzte Aktivität von Wnt- und Notch-/Fgf-Signalen festgelegt^{97;98;108}. In der normalen Haut kontrolliert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Auswölbung des Haarfollikels die Differenzierung von Stammzellen in Haarzellen¹⁰⁹. In epidermalen Tumoren hingegen erhält β -Catenin die Selbsterneuerung von Krebsstammzellen in der Haut aufrecht¹¹⁰. Während des regulären Haarzyklus wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch den BmpRIa-Signaltransduktionsweg zyklisch gehemmt und ist somit für die oszillierende Erneuerung und Differenzierung der Haarfollikel-Stammzellen in der Auswölbung der Haarfollikel entscheidend^{111;112}.

In sich-ständig erneuernden Organen ist der kanonische Wnt-Signalweg für die Selbsterneuerung von multipotenten Stammzellen verantwortlich, z.B. im Dünndarm, im hämatopoetischen System und in der Haut^{110;113-121}. In anderen Organen kontrolliert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Bildung, die Aufrechterhaltung oder die Spezifizierung von spezifischen Zellvorläuferpopulationen, welche das Potential haben in zwei oder mehrere verschiedene Zellwege differenzieren zu können, z.B. in der Hypophyse, im dorsalen Rückenmark oder während der Knochenbildung¹²²⁻¹²⁵. In der anterioren Hypophyse aktiviert β -Catenin/LEF/TCF die Expression von Pitx2, welches für die Bildung von Pit1-exprimierenden Zellvorläufern verantwortlich ist, hat jedoch keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung und Differenzierung dieser Vorläuferzellpopulation¹²⁴. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass β -Catenin während der Knochenentwicklung die Differenzierung von osteochondrogenen Zellvorläufern in Osteoblasten induziert¹²³. Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf die Aufrechterhaltung von Vorläuferzellen lässt sich an der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks erklären. Im dorsalen

Rückenmark befindet sich im Inneren eine Zone von sechs neuronalen Vorläuferzellpopulationen (p1-p6), aus welchen sechs verschiedene postmitotische Interneurone (dI1-dI6) hervorgehen. Vorläuferpopulationen sowie postmitotische Interneurone können aufgrund der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. In Vorläuferzellen p1-3 ist Olig3 exprimiert und kontrolliert die Differenzierung in Foxd3-exprimierende (dI2) und Isl1/2-exprimierende (dI3) Interneurone¹²⁶. In der Studie von Zechner et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass der BmpRIb für die Aktivierung des kanonischen Wnt/Signalweges im dorsalen Rückenmark verantwortlich ist. Die konditionelle Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges resultiert in der verstärkten Proliferation der Olig3-exprimierenden Vorläuferzellpopulation und in der Differenzierung überzähliger Foxd3- und Isl1/2-exprimierender postmitotischer Interneurone¹²⁵. Im Gegensatz dazu führt der Verlust von β -Catenin zum Verlust Olig3-exprimierender Vorläuferzellen und der konventionelle Verlust von Olig3 verhindert die Bildung von dI2- und dI3-Neuronen^{122;126}. Die Kombination aus Olig3-Nullmutation und konditioneller Stabilisierung von β -Catenin im dorsalen Rückenmark bewirkt den Verlust der dI2- und dI3-Neurone und die Verbreiterung der Domäne Lbx1-exprimierender Neurone (dI4-dI6), während der proliferative Effekt auf die Vorläuferzellzone erhalten bleibt. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg entscheidend ist für die Bildung und Aufrechterhaltung von Olig3-exprimierenden Vorläuferzellen, jedoch nicht für die Differenzierung in dI2- und dI3-Neurone¹²⁵.

Der Tgf- β / Bmp-Signaltransduktionsweg

Die Tgf- β / Bmp-Signalgebung wird durch verschiedene extrazellulär-sezernierte Liganden aktiviert. Im Säuger genom befinden sich mindestens 30 Gene, welche unterschiedliche Liganden kodieren, drei Tgf- β Isoformen, vier Activine, Nodal, zehn Bmps, MIS (Müllerian-inhibiting substance) und elf GDFs (Growth and Differentiation Factors)¹²⁷. Diese Liganden werden als Pre-Proproteine synthetisiert, welche über ihre Pro-Domänen dimerisieren bevor sie von Proprotein-Konvertasen gespalten und als reife Liganden-Homodimere sezerniert werden¹²⁷⁻¹²⁹. Der Liganden-Homodimer bindet an zwei Serin-/Threoninrezeptorkinasen (Typ I und Typ II), so dass ein hetero-tetramerer Rezeptorkomplex entsteht^{130;131}. Abhängig vom Liganden und Typ I Rezeptor wird intrazellulär entweder die Smad2/3-Signalkaskade angeschaltet, welche Tgf- β -spezifische

Zielgene aktiviert oder die Smad1/5/8-Signalkaskade, welche Bmp-spezifische Zielgene aktiviert¹³¹⁻¹³⁸.

Der Bmp-Signaltransduktionsweg

Im Bmp-Signaltransduktionsweg werden Bmp-spezifische Zielgene durch die Phosphorylierung von Smad1/5/8, Komplexierung mit Smad4 und dessen Translokation in den Zellkern aktiviert (Abb.2). Der Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 ist ausschlaggebend für die Bmp-Signaltransduktion und wird durch Typ I Serin-/ Threoninrezeptorkinasen kontrolliert. Durch die Liganden-Bindung an Typ I- und Typ II-Rezeptoren werden beide Rezeptoren nahe aneinander gebracht, FKBP12-Proteine lösen sich vom N-terminalen Phosphorylierungsmotiv im Typ I-Rezeptor, so dass der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor dort phosphorylieren kann^{130;131;139-141}. In Säugern existieren vier verschiedene Bmp-Typ I-Rezeptoren (ActRII auch Alk1, ActRIa auch Alk2, BmpRIa auch Alk3 und BmpRIb auch Alk6 genannt) und drei Bmp-Typ II-Rezeptoren (ActRII, BmpRII und MISRII)¹²⁷. Abhängig vom Liganden-Homodimer bildet sich ein Hetero-Tetramer mit verschiedenen Typ I- und Typ II-Rezeptoren (s.Abb.2). So können z.B. Bmp2- oder Bmp4-Homodimere an den Bmp-Rezeptor Ia (BmpRIa) und BmpRII (Typ II) binden und resultieren in der Phosphorylierung des BmpRIa an zwei Serinen. Durch die Phosphorylierung des Typ I-Rezeptor wird eine Bindungsstelle für rezeptorreguliertes-Smad1/5/8 gebildet und die Proteinkinasendomäne des Typ I-Rezeptor phosphoryliert gebundenes Smad1/5/8 C-terminal^{131;142;143}. C-terminal phosphoryliertes Smad1/5/8 bildet einen Hetero-Trimerkomplex mit Smad4 und wird in den Zellkern transloziert^{131;143-145}. Im Zellkern bindet der Hetero-Trimerkomplex an die DNA und aktiviert in Anwesenheit von Ko-Aktivatoren, wie z.B. OAZ (Olf-1/EBF Associated Zinc finger) oder CBP/p300, die Transkription von Bmp-spezifischen Zielgenen^{131;146-149}. Es existieren zahlreiche Gene, deren Transkription durch den phosphorylierten Smad1/5/8-Smad4-Komplex aktiviert wird. Zu den Bmp-spezifischen Zielgenen gehören verschiedene Transkriptionsfaktoren (Vent2, Msx, Gata4, Nkx2-5), Inhibitoren für basische Helix-Loop-Helix(bHLH)-Transkriptionsfaktoren (Id1, Id2, Id3), Gene die Zelldifferenzierung (Osteopontin) regulieren oder den Bmp-Signalweg negativ autoregulieren können (Smad6, Smad7, Bambi, Noggin)¹³⁸.

Neben der Smad1/5/8-vermittelten Signaltransduktion können Bmp-aktivierte Typ I-Rezeptoren mit XIAP interagieren. XIAP aktiviert die Tak1-MAPK-Kaskade und resultiert in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche an Bmp-aktivierte Smads binden und so Bmp-spezifische Zielgene aktivieren, jedoch auch die Aktivität von Smad1 inhibieren können¹⁵⁰⁻¹⁵³. Auf der anderen Seite können durch die Aktivierung von TAK1-NLK LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und somit der Wnt-induzierte transkriptionelle β -Catenin/LEF/TCF-Komplex inhibiert werden¹⁵⁴.

Der Bmp-Signaltransduktionsweg kann intrazellulär, membranständig und extrazellulär gehemmt werden (s. Abb. 2). Zu den extrazellulären Inhibitoren der Bmp-Signalgebung gehören Noggin, Gremlin, Chordin und Follistatin, welche in der interstitiellen Flüssigkeit mit Liganden interagieren können und so mit Typ I- und Typ II-Rezeptoren um deren Interaktion kompetieren¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. In der Membran kann der Pseudorezeptor Bambi mit Typ I-Rezeptoren um deren Bindung an Liganden konkurrieren. Im Gegensatz zu Typ I-Rezeptoren fehlen dem Bambi-Pseudorezeptor das Phosphorylierungsmotiv und die intrazelluläre Kinasendomäne, so dass keine Aktivierung von Rezeptor-regulierten-Smad-Proteinen initiiert werden kann^{159;160}. Im Zytoplasma wirken inhibitorische Smads hemmend auf die Bindung von Smad1/5/8 an Typ I-Rezeptoren (Smad7) oder blockieren die Bindung phosphorylierter Smad1/5/8 an Smad4 (Smad6)^{131;161;162}. Smurf-Ubiquitin-Ligasen können an Smads und Rezeptoren binden und deren proteasomalen Abbau induzieren^{131;163;164}.

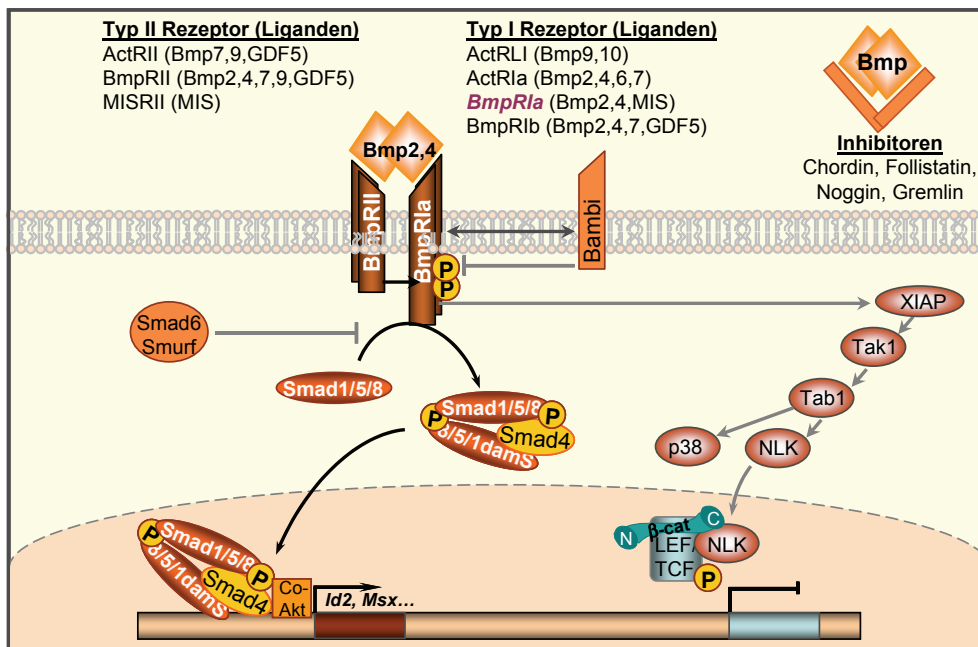


Abb. 2: Der Bmp-Signaltransduktionsweg am Beispiel von Bmp Rezeptor Ia. Bmp-Homodimere binden an Typ I und Typ II Rezeptoren und vermitteln die Smad1/5/8 oder die MAPK- induzierte Signalübertragung. Durch die Bindung von Bmp2 oder Bmp4- Homodimeren an den BmpRIa (Typ I) entsteht ein Komplex mit BmpRII (Typ II), welcher BmpRIa C-terminal phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der aktive BmpRIa phosphoryliert rezeptoraktivierbares Smad1/5/8, initiiert damit dessen Bindung an Smad4 und Translokation in den Zellkern. Im Zellkern bindet der Smad-Komplex, bestehend aus pSmad1/5/8 und Smad4, an Smad-spezifische Promotorregionen und aktiviert mit Hilfe von Ko-Aktivatoren die Expression Bmp-spezifischer Zielgene. Bmp-Inhibitoren, Bambi, Smad6 und Smurf hemmen die Bmp-Smad1/5/8 Signalübertragung auf Liganden-, Rezeptor- oder Smad1/5/8-Ebene. Neben dem Bmp-Smad-Signalweg existiert die Bmp-MAPK-Signalübertragung. Nach Aktivierung eines Typ I- Bmp-Rezeptors kann dieser mit XIAP interagieren und die Tak1-Tab1-NLK/p38-MAPK-Signalkaskade initiieren. NLK hemmt den Wnt/β-Catenin Signalweg auf Promotorebene durch Phosphorylierung von LEF/TCF im β-Catenin/LEF/TCF-Komplex. ActR, Activin Rezeptor; ActRL, Activin Rezeptor like; β-cat, β-Catenin; Bmp, Bone morphogenic protein; BmpR, Bmp-Rezeptor; GDF, Growth and Differentiation Factor; MAPK, Mitogen Aktivierte Proteinkinase; MIS, Muellerian Inhibiting Substance; NLK, Nemolike Kinase; P, Phosphorylierung; R, Rezeptor; XIAP, Xenopus Inhibitor of Apoptosis Protein. Die Abbildung wurde modifiziert nach^{127;165}.

Der Einfluss des Bmp-Signalweges auf die murine Embryonalentwicklung

Bmp-Liganden wurden ursprünglich 1965 entdeckt und erhielten ihren Namen aufgrund ihrer ektopischen, Knochen-induzierenden Wirkung in Muskeln und ihrer Wirkung als Morphogen^{166;167}. Erstmalige genetische Hinweise lieferten konventionelle Bmp5-Nullmutanten, welche Defekte in der Schädelbildung und in axialen Strukturen aufwiesen¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Knochen bilden sich einerseits aus Osteoklasten (hämatopoetischen Ursprungs) und mineralisierenden Osteoblasten, welche im kondensierten Mesenchym durch Differenzierung osteochondrogener Vorläuferzellen und Freisetzung von Osteoid gebildet werden, desmale Knochenbildung (z.B. bestimmte Schädelknochen). Andererseits bilden sich Knochen endochondral, d.h. im kondensierten Mesenchym differenzieren osteochondrogene Vorläuferzellen in Chondrozyten und bilden proliferierendes Knorpelgewebe. Im Inneren der Knorpelschicht wird die chondrogene Proliferation eingestellt und es bilden sich hypertrophe Chondrozyten, welche die Osteoblastendifferenzierung induzieren können (z.B. Gliedmaßenskelett)¹⁷¹. Bmp6- und BmpRIb-Nullmutanten zeigen Verknöcherungs- und Gliedmaßenskelettdefekte, während Noggin-Nullmutanten vorzeitige endochondrale Knochenbildung durch verbreiterte Chondrogenese aufweisen¹⁷²⁻¹⁷⁵. Es konnte gezeigt werden, dass die konditionelle Aktivierung der Bmp-Typ I-Rezeptoren, BmpRIa und BmpRIb, zu eine Überproduktion an Chondrozyten und somit zu endochondraler Knochenbildung führt¹⁷⁶. Dabei ist die Signalgebung über BmpRIb hauptsächlich für die Kondensierung des Mesenchyms verantwortlich während der BmpRIa Wachstum und Differenzierung von Chondrozyten kontrolliert¹⁷⁷. Neben der entscheidenden Rolle der Bmp-Signaltransduktion während der Knochenentwicklung sind Bmp-Liganden während der Embryonalentwicklung in vielen Organen exprimiert^{167;177}.

Bereits vor Beginn der Gastrulation ist die Aktivierung des Bmp-Signalweges entscheidend für die Mesoderminduktion^{178;179}. Konventionelle Nullmutationen in Komponenten des Bmp-Signalweges resultieren in früh-embryonal lethale Phänotypen vor Beginn und in späten Stadien der Gastrulation (z.B. BmpRIa^{-/-}, BmpRII^{-/-}, ActRIa^{-/-}, Bmp4^{-/-}) bzw. aufgrund extraembryonal-mesodermaler Defekte um E9.5 (z.B. Smad1^{-/-})¹⁸⁰⁻¹⁸⁵. So verhindert der konventionelle Verlust von Bmp4 oder BmpRIa die Bildung des mesodermalen Keimblattes^{180;181}. Der spezifische Verlust von Bmp4 sowie BmpRIa im

Epiblast zeigte, dass diese Embryonen normal gastrulieren, d.h. Bmp4 sowie BmpRIa werden im extraembryonalem Ektoderm und primitiven Endoderm benötigt, um die Entstehung des mesodermalen Keimblattes zu induzieren¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Des Weiteren kontrolliert der Bmp-Signalweg die Bildung, Aufrechterhaltung oder Differenzierung spezifischer Vorläuferzellpopulationen, z.B. in den Keimzellvorläufern, im Pankreas, oder im dorsalen Rückenmark. Nach Neuralrohrschließung werden z.B. verstärkt Bmp-Liganden aus der Dachplatte des dorsalen Rückenmarks sezerniert. Die Aktivierung des Bmp-Signalweges bewirkt die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in Vorläuferzellen p1-3 (s. Kapitel zu Wnt-Signalweg und Embryonalentwicklung). Während der Wnt-Signalweg für die Aufrechterhaltung von Olig3-exprimierenden Vorläuferzellen verantwortlich ist, kontrolliert der Bmp-Signalweg die Differenzierung der an die Dachplatte angrenzenden Math1-exprimierenden Vorläuferzellen in Lhx2/9-exprimierende Neurone (dI1)^{189;190}. Der konditionelle Verlust von BmpRIa und BmpRIb führt zum völligen Verlust von dI1-Neuronen¹⁹¹, während die konstitutive Aktivierung von BmpRIa die Überproliferation neuraler Strukturen und die konstitutive Aktivierung von BmpRIb die frühzeitige Differenzierung in Neuronen auslöst¹⁹². Im Gegensatz dazu hält die Aktivierung des Bmp-Signalweges die Selbsterneuerung von Pankreasvorläuferzellen aufrecht. Durch die Aktivierung des Bmp-Zielgenes Id2 in diesen Vorläuferzellen werden bHLH-Transkriptionsfaktoren NeuroD und Pax6 inhibiert und somit die Differenzierung in endokrine Zellen unterbunden¹⁹³. Neben der Funktion des Bmp-Signalweges in der Aufrechterhaltung und Spezialisierung von Vorläuferzellen ist der Bmp-Signalweg z.B. unerlässlich für die Bildung von Keimzellvorläuferzellen^{181;194;195}.

In einigen embryonalen Strukturen ist ein Bmp-Morphogen-Gradient wichtig, so dass die Bmp-Signalgebung konzentrationsabhängig die Aufrechterhaltung von Stammzellen (geringer Bmp-Gehalt), die Spezialisierung in und Aufrechterhaltung von Vorläuferzellen (hoher Bmp-Gehalt) oder deren Zelltod (sehr hoher Bmp-Gehalt) kontrolliert¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. Dieses Phänomen wurde in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen beobachtet²⁰⁰. Im Vorderhirn bewirkt die geregelte Aktivierung des Bmp-Signalweges die Differenzierung von Gliavorläuferzellen in Astrozyten und deren Aufrechterhaltung, verhindert andererseits jedoch die Bildung von Oligodendrozyten²⁰⁰⁻²⁰³. Ein zu hoher Gehalt an Bmp-Signalen im Vorderhirn, wie er in Chordin^{-/-}Noggin^{+/-}-Doppelmutanten zu finden ist, führt hingegen zu verstärkter Apoptose und Holoprosenzephalie²⁰⁴.

Die embryonale Herzentwicklung in Säugern

Das Herz ist das erste Organ, welches sich während der Embryonalentwicklung von Vertebraten bildet. Die Herzentwicklung von Säugern benötigt die koordinierte Rekrutierung von zwei Herzvorläufer-Populationen, dem ersten und zweiten Herzfeld, welche sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzellpopulation während der Gastrulation bilden²⁰⁵ (Abb.3). Beim Start der Gastrulation am embryonalen Tag (E) 6.5 führen Epiblastenzellen an der Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Ektoderm im posterioren Bereich (Primitivleiste) eine epithelial-mesenchymale Veränderung der Zellstruktur durch; infolge verschiedener Einflüsse (z.B. extraembryonale Bmp- und Nodal-Signale und embryonale Wnt-Signale)^{80;179;206;207}. Zwischen E6.5 bis E7.5 wandern vielzählige Epiblastenzellen durch die Primitivleiste und erhalten auf ihrem Weg von proximal nach distal (embryonaler Knoten) Signale von angrenzenden Zellen, welche über ihren zukünftigen Zellcharakter (d.h. endodermal oder mesodermal) sowie ihre zukünftige Position im Embryo entscheiden. Erste Zellen, welche in die proximale Primitivleiste einwandern und einen mesodermalen Zellcharakter annehmen, exprimieren den Transkriptionsfaktor MesP1 (Mesoderm Posterior 1) und werden als Herzvorläuferzellen bezeichnet^{208;209}. MesP1-exprimierende Herzvorläuferzellen bilden zwei Herzvorläufer-Populationen, das erste Herzfeld und das zweite Herzfeld. Vorläuferzellen des ersten Herzfeldes gefolgt von denen des zweiten Herzfeldes wandern als zwei bilaterale mesodermale Flügel aus der Primitivleiste aus und fusionieren an E7.75 im zukünftigen Kopfbereich des Embryos^{205;210;211}. Dabei bilden Vorläuferzellen des ersten Herzfeldes den Herzbogen, während sich Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes dorso-medial zum Herzbogen ansiedeln (Abb.3). Zellen aus beiden Vorläuferzellpopulationen vervielfachen sich und wandern zur Mittellinie. An der Mittellinie fusionieren Zellen des ersten Herzfeldes an E8.35 zum linearen Herzrohr und differenzieren in Kardiomyozyten des primitiven Ventrikels, welcher später zum linken Ventrikel wird²⁰⁵. Zellen des zweiten Herzfeldes, welche dorsal zum primitiven Ventrikel zu finden sind, behalten ihren Vorläuferzellcharakter zu diesem Entwicklungszeitpunkt. Zwischen E8.5 bis E9.5 proliferieren sie stark, wandern in den primitiven Ventrikel ein, initiieren so die Windung des Herzens und differenzieren in Kardiomyozyten des Ausflusstraktes, des rechten Ventrikels und beider Atrien (Vorhöfe)^{205;212-218}. Die Richtung der Herzwindung (rechtsseitig) wird zwischen E8.0 bis E8.3 durch die Nodal-Signalgebung und somit Festlegung der Links/Rechtsachse des Embryos bestimmt²¹⁹. Für die Bestimmung der zukünftigen linken Seite des Embryos ist die Ausrichtung und Rotationsrichtung der Zilien

am distalsten Punkt der Primitivleiste (embryonaler Knoten) verantwortlich. Durch die extraembryonale Flüssigkeit, die am Knoten vorbeifließt, rotieren die Zilien in unidirektionale Richtung, so dass Nodal-Liganden mit der extraembryonalen Flüssigkeit zur linken Seite des Embryos gelangen²²⁰⁻²²³. In Anwesenheit von Nodal-Liganden können diese an ActRIb, ActRII und Cripto-Ko-Rezeptoren binden, die Smad2-Phosphorylierung und Aktivierung Tgf β -spezifischer Zielgene induzieren, z.B. von Pitx2, Nodal selbst, und dessen Repressoren Lefty1/2^{219;224-231}. Zwischen E8.0-E8.3 breitet sich so von Zelle zu Zelle ein abnehmender Nodal/Lefty2-Gradient im linken lateralen Plattenmesoderm aus, welcher sich bis in den Herzbogen fortsetzt. Nodal-Liganden gelangen nicht nur zum lateralen Plattenmesoderm sondern auch zur linken Seite der Mittellinie des Embryos (Notochord, Bodenplatte des Neuralrohres) und aktivieren dort die Expression von Lefty1. Lefty1 begrenzt so den Nodalfluss zur rechten Seite des Embryos^{219;232}. Bis E8.3 nimmt die Expression von Nodal und Lefty1/2 stetig ab, so dass nach E8.35 lediglich die linkseitige Expression von Pitx2c detektierbar ist^{219;231;233}. Zellen im caudalen Bereich des linearen Herzrohres, welche zuvor Nodal- und Lefty2-Signale empfangen, beugen sich zuerst zur linken Seite und schieben die Atrien nach cranio-dorsal während der craniale Bereich des Herzrohres eine rechtsseitige Rotation vollzieht²³⁴. Durch die rechtsgerichtete Windung des Herzens bestimmt sich die Position von rechten zum linken Ventrikel; das linke Atrium ordnet sich so direkt über den linken Ventrikel und das rechte Atrium direkt über dem rechten Ventrikel an²³⁴. Neben ersten und zweiten Herzfeldzellen ist eine dritte Vorläuferzellpopulation (Neuralleistenzellen) an der korrekten Herzentwicklung beteiligt. Neuralleistenzellen wandern nach Neuralrohrschließung (um E8.5) an der Grenze zwischen Ektoderm und Neuroektoderm nach ventral aus, wobei Neuralleistenzellen aus dem anterioren Neuralrohrbereich in craniale Bereiche des Herzens (Ausflusstrakt und Atrien) einwandern^{213;235-237}. Neben zweiten Herzfeldzellen sind Neuralleistenzellen zwischen E9.0 bis E13.5 an der korrekten Teilung des Ausflusstraktes, Formierung der großen Gefäße sowie an der Verschmelzung und Bildung interatrialer Scheidewände und atrioventrikularer Herzklappen beteiligt. Die Blutversorgung erfolgt an E8.5 über ein primitives Blutgefäßsystem, bestehend aus zwei paarigen Gefäßen am Ein- und Ausflusstrakt²³⁸. Die arteriellen Hauptgefäße teilen sich zwischen E9.5 bis E11 in sechs paarige Kiemenbogengefäße auf, wobei Endothelvorläuferzellen aus dem Hauptgefäß herauswandern und vorläufige Gefäße bilden, welche später von glatter Muskulatur umkleidet werden²³⁸⁻²⁴⁰. Endothelvorläuferzellen und glatte Muskulaturzellen des Herzens können aus zweiten Herzvorläuferzellen und Neuralleistenzellen differenzieren²⁴¹⁻²⁴⁴. An

E12 bis E13.5 unterzieht sich der Ausflusstrakt mit den symmetrisch-angeordneten sechs Gefäßen einer rechtsseitigen 90° Drehung, ausgelöst durch verstärkte Proliferation auf der linken Seite. Auf diese Weise wird das sechste Kiemenbogenblutgefäß verschoben, nicht ausreichend versorgt und bildet sich zurück. Als Folge dessen verstärkt sich der Blutfluß auf der linken Seite und die Gefäße auf der linken Seite werden verstärkt^{238;245}. Die Entwicklung eines funktionstüchtigen, vierkammerigen Herzens ist damit an E13.5 abgeschlossen.

Im Gegensatz zum vierkammerigen Herz in Säugern, Vögeln und Reptilien, bilden Herzmuskelzellen einen kontraktile Schlundring in Nematoden (z.B. *C.elegans*), einen durch eine Herzklappe geteilten dorsalen Herzschlauch bestehend aus posteriorem Lumen und anteriorer Aorta-ähnlichen Struktur in Anthropoden (z.B. *Drosophila*), ein lineares Herzhorn aus einem Atrium sowie Ventrikel in Fischen (z.B. Zebrafisch) oder zwei Atrien und einem Ventrikel in Amphibien (z.B. *Xenopus*)²⁴⁶.

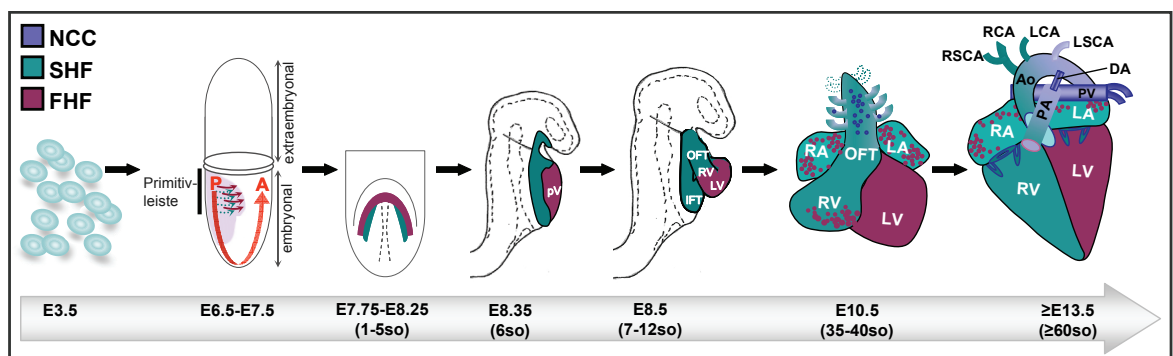


Abb. 3: Die Entwicklung des embryonalen Herzens in der Maus. Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der embryonalen Herzentwicklung. Aus einer Blastozyste an E3.5 entwickelt sich ein gastrulierender Embryo an E6.5 (Seitenansicht). Während der Gastrulation wandern mesodermale Herzvorläuferzellen des ersten (rot, FHF) und zweiten Herzfeldes (grün, SHF) aus der Primitivleiste zur späteren Herzregion und formen dort einen Herzbogen an E7.75 (Frontalansicht). Zellen aus beiden Herzfeldern expandieren und migrieren zur Mittellinie an der sie fusionieren und ein lineares Herzhorn bilden (E8.35, Seitenansicht). Im linearen Herzhorn differenzieren Zellen des ersten Herzfeldes (rot) in Kardiomyozyten des primitiven Ventrikels (pV), späterer linker Ventrikel (LV), während Zellen des zweiten Herzfeldes ihren Vorläuferzellcharakter behalten und sich dorsal zum pV ansiedeln. Zellen des zweiten Herzfeldes expandieren (E8.35-E9.5), initiieren die Windung des Herzens und differenzieren in Kardiomyozyten des Ausflusstraktes (OFT), rechten Ventrikels (RV) und beider Atrien (RA, LA). Neuralleistenzellen (NCC) wandern nach E9.0 in den Ausflusstrakt ein und fördern die Bildung, Rotation sowie Teilung der großen Gefäße und Herzklappenbildung, so dass bis E13.5 die Entwicklung eines funktionstüchtigen vierkammerigen Herzens abgeschlossen ist. A, anterior; Ao, Aorta; DA, Ductus Arteriosus; IFT, inflow tract; NCC, neural crest cells; OFT, outflow tract; P, posterior; PA, Pulmonararterie; PV, Pulmonarvene; RA and LA, rechtes und linkes Atrium (Vorhof); RKA and LKA, rechte und linke Karotisarterie; RSCA and LSCA, rechte und linke Subclavianarterie; SHF, second heart field. Die Abbildung wurde modifiziert nach^{205;247;248}.

Die Rolle von Genexpression und Signalgebung in der Herzentwicklung

Die Herzentwicklung wird über ein breites Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle kontrolliert (Abb.4). Dieses stetig wachsende Netzwerk an herzspezifischen Molekülen sowie deren zeitliche und regionale Regulation in der Entwicklung unterschiedlicher Herzbereiche ist derzeit nur bruchstückhaft entschlüsselt. Früheste Transkriptionsfaktoren, welche in beiden Herzfeldern des sich bildenden Herzbogens exprimiert werden sind Gata4/5/6 und Nkx2-5. In den Promotorregionen dieser Gene befinden sich Bmp-spezifische Smad-Bindestellen, so dass z.B. Bmp4 direkt die Expression von Gata4 regulieren kann, während Bmp-Signale zusammen mit Gata-Faktoren die Transkription von Nkx2-5 kontrollieren²⁴⁹⁻²⁵². Gata4 und Nkx2-5 sind in differenzierenden Kardiomyozyten beider Herzfelder sowie in Neuralleistenzellen exprimiert und können zeitlich und regional in Anwesenheit von verschiedenen Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren die Expression herzspezifischer Proteine initiieren (Abb.4). In differenzierten Kardiomyozyten der Ventrikel und Atrien wird MLC2a (Myosin-light-chain2a) exprimiert, welches in Anwesenheit von Nkx2-5, Gata4, Mef2 und RAR aktiviert wird²⁵³ sowie andere kontraktile Proteine (z.B. MHCs, cardiac α Actin, TroponinT). Von E7.75 können Zellen beider Herzvorläuferpopulationen aufgrund der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle unterschieden werden. Zellen des ersten Herzfeldes exprimieren z.B. Tbx5, eHand und Bmp10, während in Zellen des zweiten Herzfeldes Islet1, dHand und Fgfs detektiert werden können^{212;215;254-258} (Abb.4, Tab.1). Die Differenzierung erster Herzfeldzellen in Kardiomyozyten des linken Ventrikels wird synergistisch durch Nkx2-5 und Tbx5 reguliert. So kontrollieren Nkx2-5, Tbx5 und Gata4/5/6 z.B. die Expression von eHand, Irx4 und Bmp10^{205;248;256;259-262}. Auf der anderen Seite ist die Notch-Signalgebung für die korrekte Bildung und Differenzierung der ventrikulären Trabekelschicht verantwortlich²⁶³.

In den zweiten Herzfeldvorläuferzellen ist der Transkriptionsfaktor Isl1 ausschlaggebend für die Entwicklung aller Derivate dieser Herzvorläufer. So führt der konventionelle Verlust von Isl1 zum Verlust des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels, kontrolliert die Aktivierung von Fgf- und Bmp-Signalen und resultiert weiterhin in einer signifikanten Verminderung von Proliferation und Migration²¹⁵ (Tab.1, Abb.4). Neben der Regulation dieser Signalmoleküle bindet Isl1 zusammen mit Gata-Faktoren an spezifische Promotorregionen von Mef2c und aktiviert so die Expression von Mef2c und indirekt dHand spezifisch im zweiten Herzfeld^{216;248;264;265}.

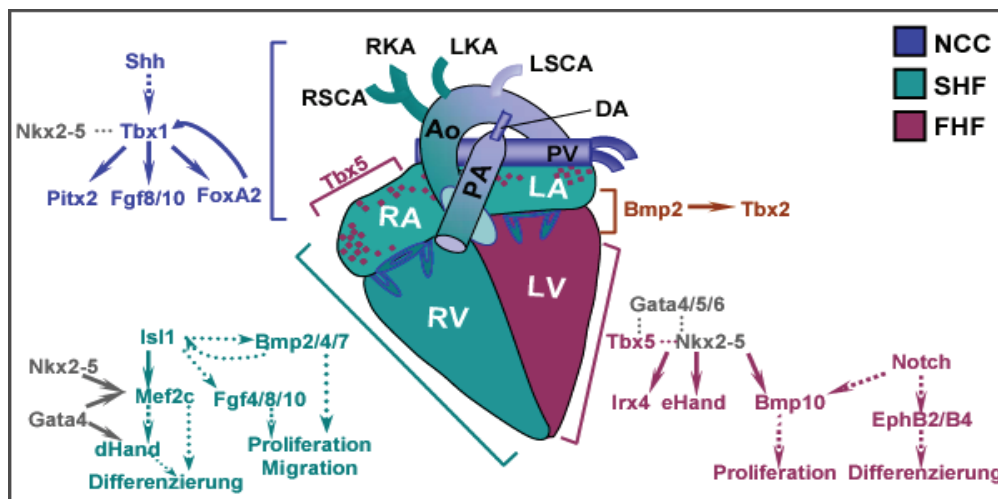


Abb. 4: Expression und Regulation von Genen während der embryonalen Herzentwicklung. Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, welche für die Entwicklung und Spezialisierung der verschiedenen Herzregionen bekannt sind. Proteininteraktionen sind mittels gepunkteter Linien zwischen den Molekülen dargestellt. Direkte positive (Pfeile) oder negative Regulation (Balken) wurden mit durchgezogenen Linien markiert, während einige Regulationen indirekt beschrieben oder noch nicht entschlüsselt wurden (gestrichelte Pfeile). Ao, Aorta; DA, Ductus Arteriosus; FHF, first heart field; IFT, inflow tract; LV, linker Ventrikel; NCC, neural crest cells; OFT, outflow tract; PA, Pulmonararterie; PV, Pulmonarvene; RV, rechter Ventrikel; RA und LA, rechtes und linkes Atrium (Vorhof); RKA und LKA, rechte und linke Karotisarterie; RSCA und LSCA, rechte und linke Subclavianarterie; SHF, second heart field. Die Abbildung wurde modifiziert nach²⁴⁸.

Für die Entwicklung des Ausflusstraktes aus zweiten Herzfeld- und Neuralleistenzellen konnte genetisch nachgewiesen werden, dass die Expression von Fgf8- und Fgf10-Liganden direkt über den Transkriptionsfaktor Tbx1 reguliert wird²⁶⁶⁻²⁶⁸, während die Expression von Tbx1 von Shh-Signalen abhängig ist²⁶⁹. Neben Shh-Signalen wird Tbx1 positiv autoreguliert, indem es FoxA2-Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche wiederum positiven Einfluss auf die Tbx1-Expression in Neuralleistenzellen haben^{267;270}. Für die korrekte Drehung der Blutgefäße des Ausflusstraktes ist die linkseitige Expression von Pitx2 verantwortlich, welches über CyclinD2 die verstärkte Proliferation im linken Ausflusstrakt kontrolliert^{245;271}. Die Regulation der Expression von Pitx2 im Ausflusstrakt des Herzens wurde auf kanonische Wnt-Signale sowie Tbx1 zurückgeführt^{248;271;272}.

Der Einfluss der Bmp-Signalgebung auf die Herzentwicklung

Die essentielle Rolle des Bmp-Signalweges in der Entwicklung des Herzmesoderms wurde bereits in Invertebraten und niederen Vertebraten beschrieben. So konnte z.B. in Drosophilalarven gezeigt werden, dass aus dem dorsalen Ektoderm sezerniertes

Decapentaplegic, *dpp* (Bmp2/4-Homolog), die Expression von *tinman* (Nkx2-5-Homolog) in angrenzenden Mesodermzellen aufrechterhalten kann, welche später zum dorsalen Herzschlauch fusionieren^{273;274}. In *dpp*-Mutanten ging hingegen die Expression von *tinman* verloren und es konnte kein Herzmesoderm gebildet werden^{275;276}. Weiterhin konnte in In Vivo- und Ex Vivo-Studien an Frosch- und Huhnbryonen gezeigt werden, dass die ektopische Expression von Bmp-Rezeptoren oder Bmp2/4-Liganden die ektopische *Nkx2-5*-Expression induziert und anschließend schlagende Kardiomyozyten gebildet werden^{277;278}. Andererseits hemmte die ektopische Noggin-Expression In Vivo die Differenzierung in Kardiomyozyten²⁷⁷. In Frosch- und Huhnbryonen wird eine Zone hoher Bmp-Aktivität benötigt, um die Herzbildung ausschließlich in Nähe des anterioren Endoderms zu initiieren. Für die Begrenzung des Herzfeldes werden Bmp2/4-Liganden aus dem anterioren Endoderm durch Noggin-Freisetzung aus dem Notochord gehemmt²⁷⁹⁻²⁸¹. Experimente in der Maus konnten die Funktion der Bmp-Signalgebung in der frühen Herzmesodermspezifizierung bisher nicht klären. So sind konventionelle Nullmutanten entweder bereits zum Zeitpunkt der Bildung des mesodermalen Keimblattes (*BmpRIa*^{-/-}, *BmpRII*^{-/-}, *ActRIa*^{-/-}, *Smad4*^{-/-}) oder kurz nach der Bildung eines lineares Herzrohrrudiments embryonal lethal (*Bmp4*^{-/-}, *Bmp2*^{-/-})^{165;180-183;282;283}. Andere Bmp-Nullmutanten entwickelten sich normal (*Bmp5*^{-/-}, *Bmp6*^{-/-}, *Bmp7*^{-/-}), zeigten jedoch in Kombination Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur im Atrioventrikularbereich (*Bmp5*^{-/-}*Bmp7*^{-/-}, *Bmp6*^{-/-}*Bmp7*^{-/-})^{165;169;173;284-286}. Mittels konditioneller Eliminierung von Bmp-Liganden oder -Rezeptoren nach Spezifizierung des Herzmesoderms konnten spät-embryonale Herzdefekte nachgewiesen werden, z.B. Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur (EMT) im Atrioventrikularbereich (Cushionbildung) und bei der korrekten Teilung der Ausflusstraktgefäße, was zumeist auf verminderte Proliferation zurückgeführt wurde^{165;287-297} (Tab.1). Die direkte Funktion des Bmp-Signalweges in der Spezifizierung des Herzmesoderms und Bildung der verschiedenen Herzvorläuferpopulationen konnte in der Maus bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss der Wnt/β-Catenin-Signalgebung auf die Herzentwicklung

Die Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalweges wird derzeit aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse aus Arbeiten in Drosophila-, Frosch- und Huhnbryonen, ES-Zellen oder Mausmutanten gegensätzlich diskutiert. So konnte z.B. in Drosophilalarven gezeigt

werden, dass bei Verlust der Winglessexpression (Wnt-1-Homolog) zu einem Zeitpunkt, an dem tinman (Nkx2-5-Homolog) bereits im dorsalen Mesoderm zu finden ist, zum vollständigen Verlust der Herzvorläuferzellen führt²⁹⁸. Andere genetisch-epistatischen Experimente, in denen Dishevelled in transgenen Wingless-Fliegenlarven überexprimiert wurde, wiesen darauf hin, dass der Wnt-Signalweg essentiell an der Entwicklung des dorsalen Herzschauches beteiligt ist²⁹⁹. Im Gegensatz dazu wurde in In Vivo- und Ex Vivo-Studien an Frosch- und Hühnembryonen deutlich, dass eine Zone niedriger Wnt-3a/-8-Aktivität benötigt wird, um die Herzbildung zu initiieren. Für die Bildung einer Zone niedriger Wnt-Aktivität scheinen aus dem Neuralrohr sezernierte Wnt-Liganden durch Wnt-Inhibitoren gehemmt zu werden, die aus dem anterioren Endoderm, Neuralrohr oder Neuralleistenzellen freigesetzt werden²⁷⁹⁻²⁸¹.

Studien mit pluripotenten Maus-ES-Zelllinien zeigten andererseits, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges mittels konditioniertem Wnt3a-Medium oder Lithiumchlorid für die Induktion herzspezifischer Gene essentiell ist³⁰⁰. Bisherige Arbeiten in Mausembryonen waren hingegen nicht aufschlussreich: I. Konventionelle β -Catenin-, Wnt-3-, Mesd- oder Lrp5/6-Nullmutanten sind bereits zum Zeitpunkt der Bildung des mesodermalen Keimblattes embryonal lethal^{79;82-84}. II. Die Expression kanonischer Wnt-Liganden und Wnt-Inhibitoren ist im frühen Herzmesoderm (Wnt-2, Wnt-2b, sFRP3), linearen Herzrohr (Wnt-8a, sFRP1) oder im Ausflusstrakt und Atrioventrikularkanal (Wnt-2b, Wnt-6, Wnt-9a, Dkk1, sFRP3) zu finden³⁰¹⁻³⁰⁵. III. Konditionelle Mausmutanten, in welchen β -Catenin in Endothelzellen oder Neuralleistenzellen eliminiert wird, zeigten Wnt-spezifische Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur im Atrioventrikularbereich sowie Defekte bei der korrekten Teilung der Gefäße des Ausflusstraktes^{271;306}. Andererseits führt der konditionelle Verlust von β -Catenin im Endoderm zur Bildung zahlreicher ektopischer HerZRudimente entlang der Antero/Posteriorachse³⁰⁷ (Tab.1). Die kontinuierliche Expression kanonischer Wnt-Liganden und -Inhibitoren im frühen Herzmesoderm, linearen Herzrohr und Ausflusstrakt des gewundenen Herzens lässt darauf schließen, dass der Wnt-Signalweg entscheidend für die gesamte murin-embryonale Herzentwicklung ist.

Tab. 1: : Phänotypen nach Eliminierung von Genen, die in Herzentwicklung involviert sind.

Gen	herzspez. Expressions- verlust	Phänotyp nach Deletion in der Maus
Herzgene		
<i>MesP1</i>	FHF, SHF	-Verlust herzspezifischen Mesoderms ²⁰⁸
<i>Nkx2-5</i>	FHF, SHF, NCC	-verkürzter OFT, Verlust RV, Herzrohrarrest, verminderte SHF-Proliferation ^{308;309}
<i>Gata4</i>	FHF, SHF	-Cardia bifida ^{310;311}
<i>eHand</i>	FHF	-Verlust des LV ²⁵⁴
<i>Tbx5</i>	FHF	-hypoplastischer LV, sinoatriale Defekte ²⁵⁶
<i>Islet1</i>	SHF	-Verlust von OFT und RV, verminderte Proliferation von SHF-Zellen, Expressionsdefekte in Fgf4/8/10 und Bmp2/4/7 ²¹⁵
<i>Fgf8</i>	SHF, NCC	-Defekte in OFT-Teilung und in Entwicklung der Kiemenbögen ²⁵⁷
<i>dHand</i>	SHF, tlw. FHF	-Verlust des RV und Verlust der Kiemenbogengefäße ²⁵⁵
<i>Mef2c</i>	FHF, SHF	-verkürzter OFT, Verlust des RV und dHand-Expression, keine Windung des linearen Herzrohres ²⁶⁴
<i>Pitx2</i>	SHF, NCC	-Defekte in OFT-Morphogenese, Herzwindungsdefekte ^{312;313}
<i>Tbx1</i>	SHF, NCC	-Verlust der Teilung des OFT, Defekte in Bildung der ventrikulären Scheidewände ^{314;315}
Bmp-spezifisch		
<i>Bmp2</i> (<i>Nkx2-5-cre</i>)	FHF, SHF	-Defekte in Entwicklung von Atrioventrikularkanal ²⁹²
<i>Bmp4</i> (<i>Nkx2-5-cre</i>) (<i>cTnT-cre</i>)	FHF, SHF Kardiomyozyten	-Defekte in OFT-Teilung und in Morphogenes der Kiemenbogenarterien ²⁹⁰ -Verlust der Verschmelzung und Bildung der Scheidewänden im Atrioventrikularkanal führt zu doppeltem Ausflusstraktgefäßausgang am RV, geringere Proliferation ²⁸⁸
<i>Bmp10</i>	Ventrikelmyokardium	-hypoplastische Ventrikelwände, Verlust der Trabekelschicht, geringere Proliferation ²⁵⁸
<i>Noggin</i>	craniales SHF	-verstärktes Myokardium, verbreiterte atrioventrikuläre Cushions ³¹⁶
<i>ActRIa</i> (<i>Tie2-cre</i>) (<i>Wnt1-cre</i>)	Endothelzellen NCC	-Verlust der Cushionbildung ²⁹³ -Defekte in OFT-Teilung ²⁸⁹

<i>BmpR1a</i> <i>(Flk1-cre)</i>	Endothelvorläuferzellen	-Defekte in Bildung der Herzcushions und in Gefäßentwicklung und -reifung ²⁹⁴
<i>(Isl1-cre)</i>	SHF	-schwere OFT-Defekte, Defekte in Bildung von Klappen und Scheidewänden ²⁹⁵
<i>(αMHC-cre)</i>	Kardiomyozyten	- verstärkte Apoptose in interventrikulären Scheidewänden, Defekte in atrioventrikulären Cushions ²⁸⁷
<i>(Tie2-cre)</i>	Endothelzellen	-Defekte in Herzcushionbildung, verstärkte Apoptose und geringere Proliferation in Cushions ²⁹⁷
<i>(Wnt1-cre)</i>	NCC	- verkürzter OFT und RV, Defekte in OFT-Teilung, geringere Proliferation im Myokardium ²⁹¹
<i>Smad4</i> <i>(Wnt1-cre)</i>	NCC	-Defekte in OFT-Teilung und Cushionhypoblasie, verminderte Proliferation ²⁹⁶
<i>Smad1</i>^{+/-}, <i>Smad5</i>^{+/-}	SHF	-Verlust der Herzwindung bzw. entgegengesetzte Herzwindung durch bilaterale Nodal-Expression, verkürzter OFT und RV ¹⁹⁵
Wnt-spezifisch		
<i>β-Catenin</i> <i>(Tie2-cre)</i>	Endothelzellen	-Defekte in Bildung der Herzcushions ³⁰⁶
<i>(Wnt1-cre)</i>	NCC	-Defekte in OFT-Teilung, Verlust von Pitx2 und CycD2-Expression, verminderte Proliferation ²⁷¹
<i>(K19-cre)</i>	Endoderm	-Bildung zahlreicher Herzrudimente entlang der embryonalen Antero/Posteriorachse ³⁰⁷
<i>Wnt3a</i>	Primitivleiste	-entgegengesetzte Windung des Herzens oder Herzrohrarrest ³¹⁷

* Cushions, mesenchymale Zellaggregate aus denen sich später Herzklappen entwickeln; cTnT, cardiac Troponin T, FHF, erstes Herzfeld [bildet linken Ventrikel (LV)]; SHF, zweites Herzfeld [bildet Ausflusstrakt (OFT), rechten Ventrikel (RV) und Atrien]; NCC, Neuralleistenzellen.

Zielstellung dieser Arbeit

Die Funktion der Bmp und Wnt-Signalgebung wurde bereits in verschiedensten Organen und zu unterschiedlichen embryonalen Entwicklungszeitpunkten beschrieben. Beide Signalwege sind essentiell an der Bildung des mesodermalen Keimblattes während der Gastrulation beteiligt. Während der Bmp-Signalweg in Studien in Drosophila-, Frosch- und Huhnembryonen bereits als positiver Regulator der frühen Herzentwicklung beschrieben wurde, sind Arbeiten in der Maus noch unzureichend. So waren konventionelle Nullmutanten bereits vor Beginn der Herzentwicklung lethal oder es konnten in

konditionellen Mausmutanten nur spät-embryonale Ausflusstraktdefekte detektiert werden. Des Weiteren ist derzeit noch ungeklärt, welche Funktion der Bmp-Signalweg auf die Entwicklung und Spezifizierung der verschiedenen Herzvorläuferpopulationen hat. Im Gegensatz zum Bmp-Signalweg existiert in der Herzentwicklung ein konträres Wissen um den kanonischen Wnt-Signalweg. In Frosch- und Huhnembryonen konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg für die frühe Herzspezifizierung gehemmt werden muss. Andererseits zeigten Arbeiten in Drosophilaembryonen oder ES-Zellkulturen den entgegengesetzten Effekt und es werden mindestens sechs kanonische Wnt-Liganden in früh-embryonalen Mausherzen exprimiert. Es existieren demnach Hinweise darauf, dass die Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege herzspezifische Zellwege während der Herzentwicklung positiv sowie negativ regulieren können. Wie diese Signalwege z.B. das komplexe transkriptionelle Netzwerk kontrollieren blieb bisher ungeklärt. Deshalb wurde in dieser Arbeit, mittels konditioneller Mutagenese in der Maus, der Einfluss der Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege auf die Entwicklung und Differenzierung von mesodermalen Herzvorläuferzellen in der früh-embryonalen Herzentwicklung untersucht.

Ergebnisse

Aktivierung der Wnt/ β -Catenin und Bmp-Signalwege im ersten und zweiten Herzfeld

Der zentrale Modulator der kanonischen Wnt-Signalkaskade ist β -Catenin³¹⁸. In Anwesenheit von kanonischen Wnt-Liganden wird β -Catenin im Zytoplasma stabilisiert und in den Zellkern transloziert. Im Zellkern aktiviert β -Catenin durch die Bindung mit LEF/TCF Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von Wnt/ β -Catenin spezifischen Zielgenen^{35-37;77;319}. Für die Bestimmung von Zellen mit Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung im sich entwickelnden Herzen wurden Axin2^{LacZ} Mäuse verwendet, in welchen die kodierenden Sequenzen des Axin2-Allels durch eine kodierende LacZ- Sequenzkassette ersetzt wurden³²⁰. Axin2 (Conductin) gehört zur Gruppe der gut charakterisierten β -Catenin/TCF Zielgene und wurde bereits in verschiedensten embryonalen Organanlagen und unterschiedlichen Entwicklungsstadien zur Bestimmung der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges eingesetzt^{41;105;125;321-323}. Mittels Immunofluoreszenz wurde dafür die Expression von β -Galaktosidase im sich entwickelnden Herzrohr von Axin2^{LacZ/+} Embryonen (im Stadium E8.35) untersucht und daraus die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bestimmt. β -Galaktosidase (β -Gal) konnte ausschließlich in Zellen des zweiten Herzfeldes, jedoch nicht in Kardiomyozyten des ersten Herzfeldes detektiert werden (grüne Fluoreszenz, markiert durch Pfeilköpfe in Abb.5A-C). Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes mit hoher Wnt/ β -Catenin-Aktivität exprimieren zusätzlich Islet1 (Isl1²¹⁵; orange/gelb durch die Überlagerung grüner und roter Fluoreszenz in Abb.5D), ein Transkriptionsfaktor, welcher eine entscheidende Rolle in der Morphogenese des zweiten Herzfeldes spielt. Neben der Bestimmung der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im Herzrohrstadium bot sich die heterozygote Axin2^{LacZ}-Mausmutante (phänotypisch Wildtyp) weiterhin zur Detektierung der Bmp-Signalaktivität an. Durch die Bindung von Bmp-Liganden an Typ I- und Typ II-Rezeptoren wird die Phosphorylierung von Smad1/5/8 induziert, welches sich mit Smad4 komplexiert und nach Transport in den Zellkern Bmp-spezifische Zielgene aktiviert¹³⁸. Zur Bestimmung der Aktivität der Bmp-Signalkaskade im sich entwickelnden Herzen wurde der Phosphorylierungsstatus von Smad1/5/8 untersucht. Phosphoryliertes Smad1/5/8 (pSmad1/5/8) konnte in Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes detektiert werden (blaue Fluoreszenz, markiert durch Pfeile und Pfeilköpfe in Abb.5E, F). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

ausschließlich in Zellen des zweiten Herzfeldes im sich entwickelnden Herzrohr aktiv ist, während die Bmp-Signalübertragung über pSmad1/5/8 in Zellen beider Herzfelder stattfindet.

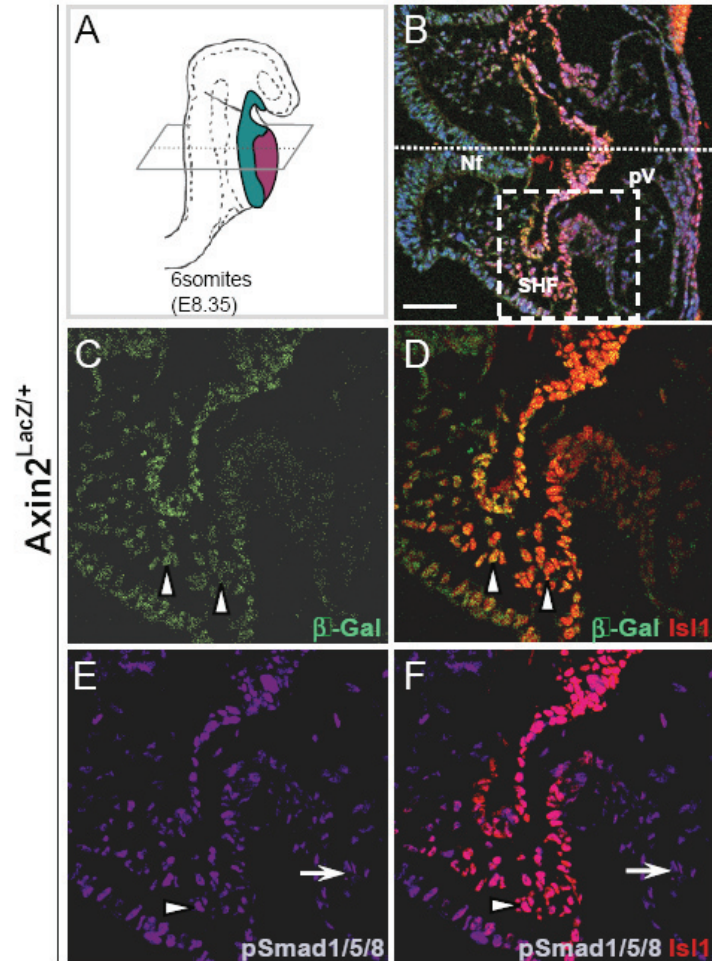


Abb. 5: Aktivierung der Wnt/ β -Catenin- und Bmp-Signalwege während der frühen Herzentwicklung. (A) Schematische Darstellung des embryonalen Herzensrohres im 6-Somitenstadium zeigt die Lokalisierung von erstem (rot) und zweitem Herzfeld (grün) sowie die für die Immunfluoreszenz verwendete Schnittebene. (B-F) Immunfluoreszenz von β -Galaktosidase (β -Gal, grün), Islet1 (Isl1, rot) und Phospho-Smad1/5/8 (pSmad1/5/8, blau) auf einem transversen Schnitt durch das Herzrohr von $Axin2^{lacZ/+}$ -Embryonen. (C-F) Die Vergrößerung des markierten Quadrates in B zeigt die Koexpression von β -Gal und Isl1 sowie pSmad1/5/8 und Isl1 im zweiten Herzfeld (Pfeilköpfe in C-F) und die zusätzliche Expression von pSmad1/5/8 im ersten Herzfeld (Pfeile in E und F). Nf, Neuralfalte; pV, primitiver Ventrikel. Maßstab in B: 50 μ m.

Generierung von β -Catenin- und BmpR1a-defizienten Mäusen, die sich phänotypisch in Herzzorläuferzellen ausdrägen

Die Phosphorylierung von Smad1/5/8 wird durch die Bmp-Rezeptorkomplex-vermittelte Aktivierung von Typ I-Rezeptoren initiiert^{133;136;137}. Es sind vier verschiedene Typ I-Rezeptoren bekannt (BmpR1a, BmpR1b, ActR1a und ActRLI), welche verschiedene Bmp-Liganden binden können und während der Embryonalentwicklung unterschiedliche Funktionen aufweisen. So führt der Verlust der BmpR1a-Funktion in der Maus zum frühen embryonalen Tod zum Beginn der Gastrulation¹⁸⁰, während der Verlust der BmpR1b-Genexpression keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat¹⁷⁵. Der Funktionsverlust der ActR1a- oder ActRLI-Gene in der Maus führt zum frühen embryonalen Tod während der Herzbogenbildung¹⁸² bzw. während der BlutgefäÙentwicklung³²⁴. Neben der Bmp-initiierten Aktivierung von Activin-Rezeptoren (ActR1a, ActRLI) und Phosphorylierung von Smad1/5/8 binden auch Activine sowie Tgf- β -Liganden, welche die Phosphorylierung von Smad2/3 auslösen und damit Tgf- β -spezifische Zielgene aktivieren^{131;134;135;144}. Der Bmp-Rezeptor 1a ist indessen spezifisch für die Phosphorylierung von Smad1/5/8 und spielt eine Rolle in der Mesodermbildung während der Gastrulation¹⁸⁰. Genexpressionsanalysen zeigten, dass der BmpR1a in wildtypischen Embryonen während der frühen Embryonalentwicklung in beiden Herzfeldern des sich formenden Herzbogens exprimiert ist (markiert durch Pfeile in Abb.6A, B) und später verstärkt im Ausflusstrakt des sich windenden Herzzhres sichtbar wird (Pfeile in Abb.6C, D).

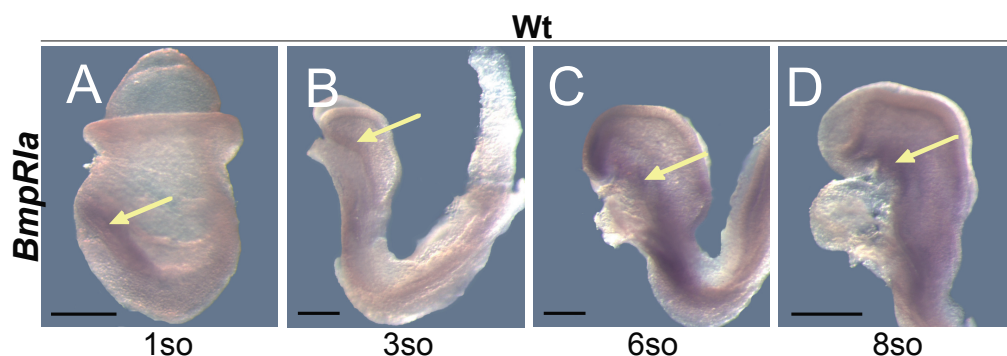


Abb. 6: *BmpR1a*-Expression im sich entwickelnden Embryo (E7.75-E8.5). (A-D) In-situ Hybridisierungen für *BmpR1a* in wildtypischen Embryonen im Kopffaltungs- (0-1- Somiten; A), Herzbogen- (3- Somiten; B), Herzzh- (6- Somiten; C) und Herzwindungsstadium (8- Somiten; D) zeigen die Expression (Pfeile) im sich formenden Herzbogen sowie im Ausflusstrakt ab dem 6- Somitenstadium. Maßstab in A-D: 100 μ m.

Um die Rolle der Bmp-vermittelten Aktivierung von Smad1/5/8 sowie der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung während der Herzentwicklung zu studieren, wurden mittels Cre/LoxP-Technik inaktivierende und aktivierende Mutationen in BmpRIa- oder β -Catenin in mesodermalen Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes eingeführt (Abb.7). Dafür wurden zum einen Mausmutanten verwendet, in welchen LoxP-Sequenzen (orange Dreiecke) in die intronischen Sequenzen vor und nach Exon 4 des BmpRIa-Genes (BmpRIa^{lox}) eingeführt wurden³²⁵. Nach Induktion der cre-Rekombination und RNA-Splicing wird nach den ersten 67 Nukleotiden eine Leserasterverschiebung erzeugt, welche nach weiteren 26 Nukleotiden ein Stop-Codon entstehen lässt und somit zum Verlust der Expression von BmpRIa führt (Mutation führt zum Funktionsverlust, LOF, Loss-of-Function-Mutation; Abb.7A). Zum anderen wurden Mausmutanten verwendet, in denen Mutationen im β -Catenin-Allel eingeführt wurden (Abb.7B), welche zum Funktionsverlust bzw. zur verstärkten Funktion (GOF, Gain-of-Function-Mutation) führen. Zur Erzeugung von Mutationen, die zum β -Catenin-Funktionsverlust führen, wurden LoxP-Sequenzen (grüne Dreiecke) in Introne eingesetzt, welche Exon 3 bis Exon 6 flankieren und nach cre-induzierter Rekombination und RNA-Splicing zu Leserasterverschiebungen nach den ersten 12 Nukleotiden führen (β -Catenin^{lox})¹⁰⁹. Außerdem wurde eine weitere β -Catenin-Mutante verwendet, in welcher LoxP-Sequenzen in Introne vor und nach Exon 3 eingesetzt wurden (β -Catenin^{loxEx3})³²⁶. Das Exon 3 kodiert für N-terminale Aminosäuren im β -Catenin-Protein, die für dessen Phosphorylierung und anschließenden Abbau essentiell sind⁴⁴⁻⁵². Die Induktion der cre-Rekombinase in dieser Mutante erzeugt ein β -Catenin-Allel, welches zur Expression von konstitutiv aktivem β -Catenin führt, dem das N-terminale Phosphorylierungsmotiv fehlt, so dass die andauernde Transkription von β -Catenin/LEF/TCF-Zielgenen aktiviert wird.

Um die Rolle der BmpRIa- und β -Catenin-induzierten Signalübertragung während der embryonalen Herzentwicklung zu untersuchen, wurden Mutationen mittels transgener Mäuse induziert, welche die cre-Rekombinase unter der Kontrolle des MesP1-Promotors exprimieren²⁰⁸. MesP1 (Mesoderm Posterior 1) ist das früheste bekannte Gen, welches mit Beginn der Gastrulation (ab E6.5) in allen mesodermalen Strukturen des ersten und zweiten Herzfeldes transkribiert wird^{208;209;327-329}. Zur Überprüfung der Aktivität der cre-Rekombinase wurde die Z/AP-Indikator-Mauslinie verwendet. Diese Mauslinie exprimiert in allen Zellen, in denen die cre-Rekombinase aktiv ist, Alkalische Phosphatase (AP)³³⁰.

Die MesP1-induzierte Expression alkalischer Phosphatase konnte dabei im sich formenden Herzbogen sowie in Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes im Herzbogen und Herzrohr detektiert werden (blaue Färbung in Abb.7C-E). Am Beispiel von Immunofluoreszenz-Untersuchungen für β -Catenin nach MesP1-cre induzierter inaktivierender β -Catenin-Mutation, konnte der Verlust der β -Catenin-Expression in mesodermalen Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen gezeigt werden (markiert durch Pfeile und Pfeilköpfe in Abb.7F, F1 und G, G1). Embryonen mit MesP1-cre-induzierter aktivierender β -Catenin-Mutation (MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}) zeigten hingegen eine verstärkte kernspezifische Expression in mesodermalen Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes (Vgl. Abb.7F, F1 und 7H, H1). Die MesP1-cre-Mauslinie eignet sich demnach, um genetisch die frühe embryonale Herzentwicklung beider Herzfelder zu studieren.

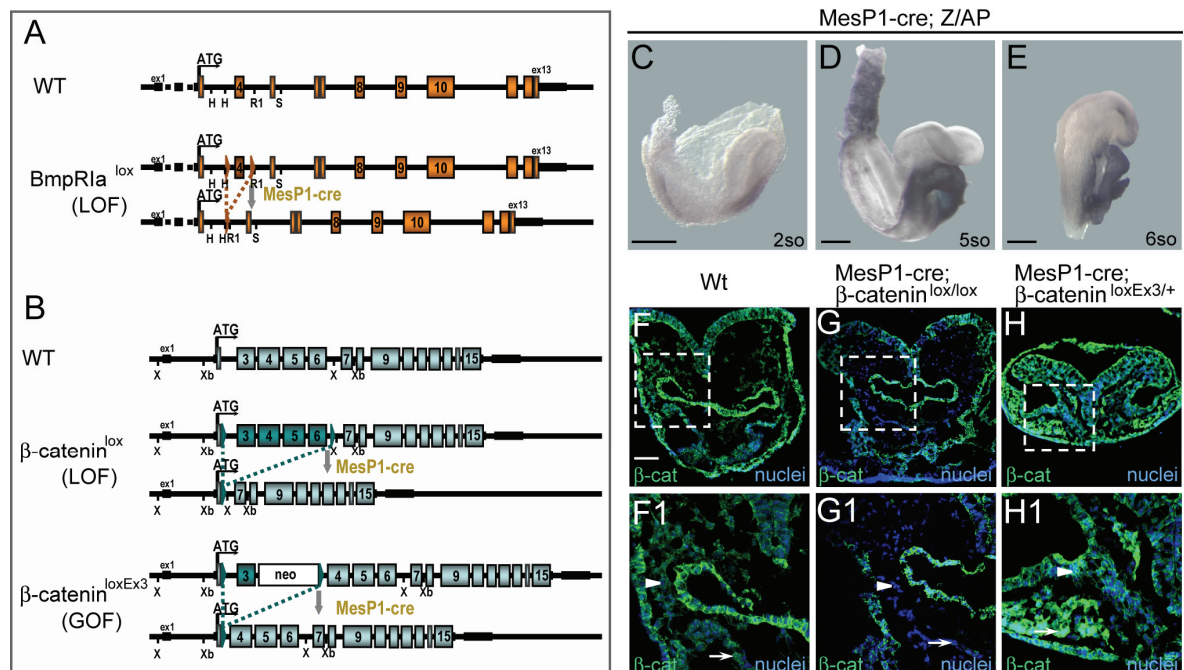


Abb. 7: Generierung MesP1-cre-vermittelter Mutationen im BmpR1a- oder β -Catenin-Gen. (A,B) Schematische Darstellung der BmpR1a- (A) und der β -Catenin-Rekombinationsvektoren (B) und der genomisch wildtypischen sowie mutierten Allele. Im BmpR1a^{lox}-Rekombinationsvektor wurden LoxP-Sequenzen (orange Dreiecke) in die Introne eingeführt, welche Exon4 flankieren³²⁵. Im β -Catenin-Rekombinationsvektor wurden LoxP-Sequenzen (grüne Dreiecke) in Introne eingeführt, welche entweder Exon3 bis Exon6 (β -Catenin^{lox})¹⁰⁹ oder Exon3 (β -Catenin^{loxEx3})³²⁶ flankieren. Durch die MesP1-cre-vermittelte Rekombination werden die Exone zwischen den LoxP-Sequenzen herausgeschnitten, so dass Mutationen in BmpR1a- und β -Catenin-Genen entstehen, welche zu deren Expressionsverlust (BmpR1a^{lox}, β -Catenin^{lox}) führen oder ein konstitutiv aktives β -Catenin (β -Catenin^{loxEx3}) erzeugen. H, HindIII; GOF, Gain-of-Function-Mutation; LOF, Loss-of-Function-Mutation; neo, Neomycin-Resistenzgen; RI, EcoRI; S, SacI; X, XhoI; Xb, XbaI; Rechtecke markieren die Exone. (C-E) Die MesP1-cre-vermittelte Expression alkalischer Phosphatase zeigt die zellspezifische Expression der cre-Recombinase im sich bildenden Herzbogen im 2-Somitenstadium (C), sowie in Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes im Herzbogen (5-Somitenstadium,

D) und im linearen Herzrohr (6-Somitenstadium, E). (F-H1) Immunofluoreszenz von β -Catenin (grün) und Kernfärbung (TOTO, blau) auf transversen Schnitten im 5-Somitenstadium. (F1-H1) Die Vergrößerungen der Quadrate in F-H zeigen den Verlust der β -Catenin-Expression in Zellen des ersten (Pfeil) und zweiten Herzfeldes (Pfeilkopf) in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen und die nukleare Lokalisierung von β -Catenin in diesen Zellen in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen. Maßstab: 100 μ m (C-E), 50 μ m (F-H).

Der Verlust der BmpR1a-Signalgebung verhindert die Bildung des ersten Herzfeldes

Zur Untersuchung der Rolle der BmpR1a-vermittelten Signalübertragung in Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes, wurden mittels MesP1-cre-Rekombinase inaktivierende Mutationen im BmpR1a-Allel eingeführt. Homozygote Mäuse mit BmpR1a^{lox}-Allel (BmpR1a^{lox/lox}) wurden dafür mit heterozygoten BmpR1a^{lox}-Mäusen verpaart, die zusätzlich das MesP1-cre-Allel tragen. MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Mäuse wurden aus diesen Verpaarungen nicht geboren, was den embryonalen Tod vermuten ließ. Aus diesem Grund wurden Embryonen an unterschiedlichen Tagen der Embryonalentwicklung (von E7.5-E10.5) entnommen, genotypisiert und verifiziert. Während an E10.5 keine MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Embryonen detektiert werden konnten, wurde bis E9 die nach Mendelschen Regeln erwartete Anzahl mutanter Embryonen beobachtet. Das äußere Erscheinungsbild an E8 bis E9.5 (2-20-Somiten) deutete bereits embryonale Störungen im anterioren Bereich von MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Embryonen an. Nähere Untersuchungen der Herzregion wurden mit Hilfe von In-Situ-Hybridisierungen für spezifische Gene des ersten und zweiten Herzfeldes durchgeführt (Abb.8). Dabei wurden phänotypisch wildtypische heterozygote BmpR1a^{lox}-Embryonen (mit oder ohne MesP1-cre) als Kontrolle eingesetzt (Wt). In-Situ-Hybridisierungen für *Nkx2-5*, ein Gen spezifisch für Myokardvorläuferzellen und differenzierende Kardiomyozyten des ersten und zweiten Herzfeldes³⁰⁸, zeigten den Verlust von Herzbogen und Herzrohrbildung in MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Embryonen im 4-8-Somitenstadium (Abb.8C, D, K, L). Während *Nkx2-5* im 2-Somitenstadium noch breit im sich formenden Herzbogen exprimiert wurde (Abb.8A, B), blieb zwischen dem 4-8-Somitenstadium nur ein kleines Feld der *Nkx2-5*-Expression in MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Embryonen zurück. Die anfangs beinahe normale Expression von *Nkx2-5* im 2-Somitenstadium ließ darauf schließen, dass Herzvorläuferzellen in MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}-Embryonen gebildet werden, jedoch möglicherweise nicht aufrechterhalten sowie differenzieren können. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde sowohl die Expression von *eHand*, *Tbx5* als auch *Gata6* getestet, welche die Entwicklung des ersten Herzfeldes und dessen Derivaten

(Herzbogen und primitiver Ventrikel) kontrollieren^{254;260;331}. In MesP1-cre; BmpRIa^{lox/lox}-Embryonen wurde die Expression dieser Gene im 4-8-Somitenstadium vollständig gestört (Abb.8E, F, M-P). Zusätzlich konnte mittels In-Situ-Hybridisierung für *MLC2a* (spezifisch für differenzierte Kardiomyozyten³³²) gezeigt werden, dass im Herzbogenstadium die Differenzierung in Kardiomyozyten unterbunden ist (Abb.8I, J). Im Gegensatz dazu wurden Gene, welche spezifisch für das zweite Herzfeld sind, wie z.B. *Isl1*²¹⁵ oder *Fgf8*^{257;327}, in BmpRIa-mutanten Embryonen im zurückbleibenden Herzfeld exprimiert (Abb.8G, H, Q, R). Weiterhin konnte in MesP1-cre; BmpRIa^{lox/lox}-Embryonen ein kleines zentrales Feld differenzierender Kardiomyozyten im 8-Somitenstadium detektiert werden (Abb.8S,T). Der spezifische Verlust von Derivaten des ersten Herzfeldes, z.B. die Bildung des primitiven Ventrikels sowie der Verlust der Marker-Genexpression im ersten Herzfeld, lassen darauf schließen, dass die Kardiomyozyten im 8-Somitenstadium aus Zellen des zweiten Herzfeldes differenzieren. Zusammenfassend zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass die BmpRIa-Signalübertragung essentiell für die Spezialisierung von Myokardvorläuferzellen im ersten Herzfeld ist.

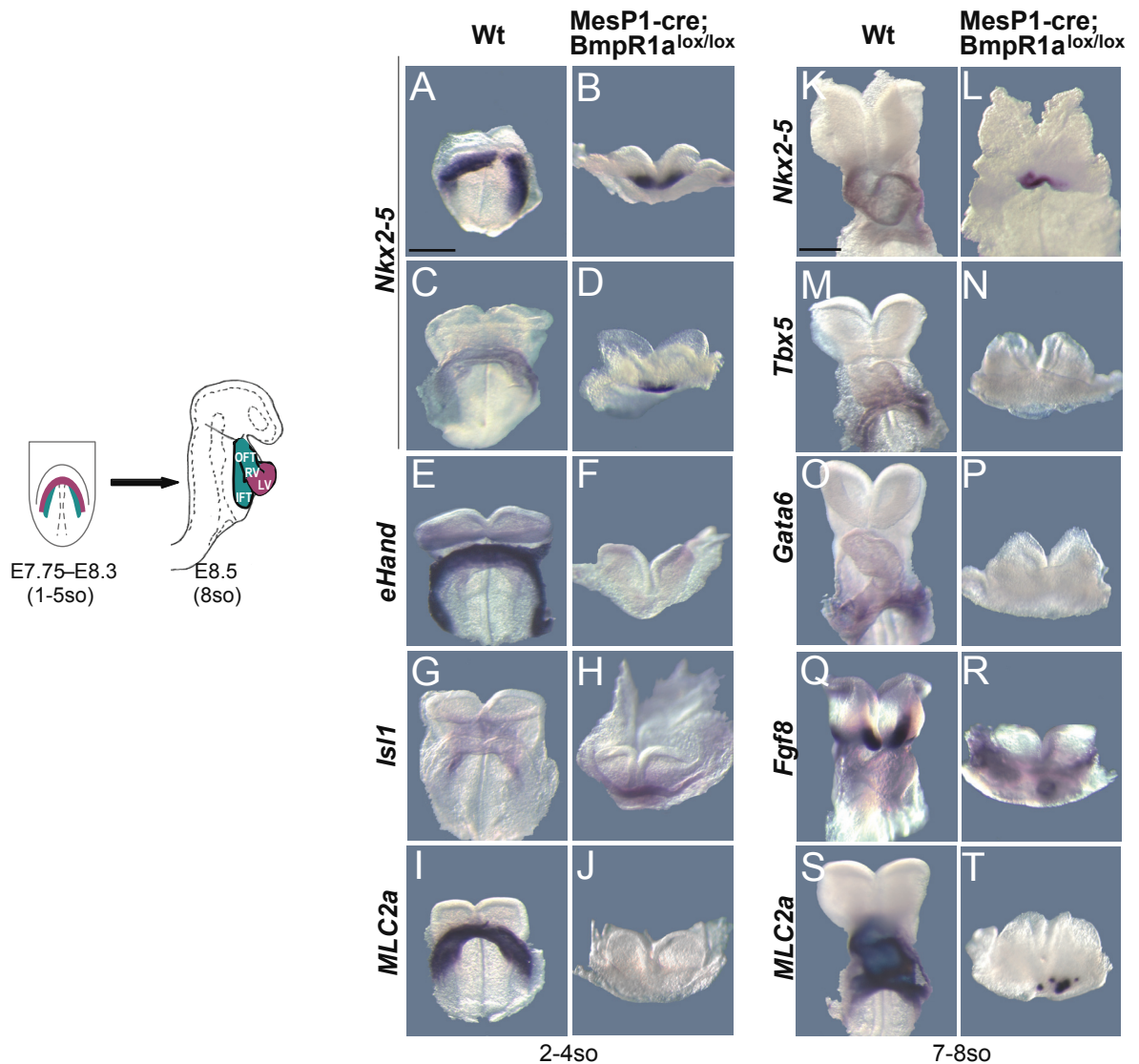


Abb. 8: Der Verlust von *BmpR1a* in *MesP1-cre*-exprimierenden Zellen verhindert die Bildung des ersten Herzfeldes. (A-T) Frontalansicht von wildtypischen (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) und *MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}*-Embryonen (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T) nach In-Situ-Hybridisierung für *Nkx2-5*, *eHand*, *Isl1*, *MLC2a*, *Tbx5*, *Gata6* und *Fgf8* im Herzbogenstadium (2-4 Somiten, A-J) und Herzwindungsstadium (8 Somiten, K-T). Die Herzbogen- und Herzrohrentwicklung sowie die Expression von Genen des ersten Herzfeldes ist in *MesP1-cre; BmpR1a^{lox/lox}*-Embryonen gestört. Maßstab: 100µm (A-J), 100µm (K-T).

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg kontrolliert die Entwicklung des zweiten Herzfeldes

Um die Funktion der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung im sich entwickelnden Herzen zu untersuchen, wurden mittels *MesP1-cre*-Rekombinase inaktivierende sowie aktivierende Mutationen im β -Catenin-Allel eingeführt. Dafür wurden zum einen homozygote Mäuse mit β -Catenin^{lox}-Allel (β -Catenin^{lox/lox}) mit heterozygoten β -Catenin^{lox}-Mäusen verpaart, die zusätzlich das *MesP1-cre*-Allel tragen. Zum anderen wurden zur Untersuchung von Mäusen mit aktivierenden β -Catenin-Mutationen im Herzen homozygote Mäuse mit β -

Catenin^{loxEx3}-Allel mit transgenen MesP1-cre-Mäusen verpaart. Die heterozygote Expression von aktivem β -Catenin wurde bereits in verschiedensten embryonalen Organanlagen als ausreichend beschrieben, um Wnt/ β -Catenin-Zielgene effizient zu aktivieren^{94;326}. Aus den unterschiedlichen Verpaarungen wurden weder MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}- noch MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Mäuse geboren, was deren embryonalen Tod vermuten ließ. Aus diesem Grund wurden Embryonen an unterschiedlichen Tagen der Embryonalentwicklung (von E7.5-E10.5) entnommen, genotypisiert und analysiert. Dabei wurde bis E8.5 (MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}) bzw. bis E8.35 (MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}) die nach Mendelschen Regeln erwartete Anzahl mutanter Embryonen beobachtet (Tab.2). Zwischen E8.5 bis E9.5 sank die Zahl der lebensfähigen embryonalen MesP1-cre-spezifischen β -Catenin-Mutanten. So konnten z.B. ab E9.0 keine überlebensfähigen MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen und ab E10.0 keine überlebensfähigen MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen detektiert werden. Für die anschließende Analyse mutanter Embryonen wurden phänotypisch wildtypische heterozygote β -Catenin^{lox}- (mit oder ohne MesP1-cre) oder β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen als Kontrolle eingesetzt (Wt).

Tab. 2: Lebensfähigkeit der Embryonen aus Verpaarungen heterozygoter β -Catenin^{lox}- und homozygoter β -Catenin^{lox}-Mäuse (A) sowie aus homozygoten β -Catenin^{loxEx3}- mit transgenen MesP1-cre-Mäusen (B).

Alter	A		B	
	MesP1-cre; β -Cat ^{lox/lox}	Kontrollen (MesP1-cre, β - Cat ^{lox/+} ; β -Cat ^{lox/lox} ; β -Cat ^{lox/+})	MesP1-cre; β -Cat ^{loxEx3/+}	Kontrolle (β -Cat ^{loxEx3/+})
E7.5-E8.35 (0-6so)	25% (103)	75% (408)	41% (31)	59% (44)
E8.5-E9.0 (7-12so)	22% (112)	78% (400)	44% (48) 4% (*4)	56% (62)
E9.0-E9.5 (13-20so)	19% (16) 5% (*4)	81% (68)	60% (6) 60% (*6)	40% (4)
E9.5- E10.0 (21-28so)	27% (6) 18% (*4)	73% (16)	39% (5) 39% (*5)	61%* (8)

* markiert die Anzahl der retardierten/toten mutanten Embryonen

Der Verlust von β -Catenin in mesodermalen Herzvorläuferzellen verhindert die Windung des Herzens

Es wurde mit dem Vergleich der Herz-Erscheinungsbilder von wildtypischen und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung begonnen. Dafür wurden zum einen In-Situ-Hybridisierungen für *Nkx2-5* und zum anderen histologische Färbungen im Herzrohr- sowie im Herzwindungsstadium durchgeführt (Abb.9). Mutante Embryonen wiesen eine mit wildtypischen Embryonen vergleichbare äußere Herzrohrform auf, Zellen aus dem Herzbogen fusionierten an der Mittellinie und die ventrale Auswölbung des primitiven Ventrikels wurde erkennbar (Vgl. *Nkx2-5* Expression in Abb.9A, B). Weiterhin zeigten histologische Färbungen sagitaler Schnitte durch das Herzrohr sowohl in wildtypischen als auch mutanten Embryonen die Bildung von Endokardium sowie eine normale Verteilung von Blutzellen im primitiven Ventrikel (pV, Abb.9C, D). Im 8-Somitenstadium wurde hingegen der Verlust der rechtsgerichteten Herzwindung in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen beobachtet. In wildtypischen Embryonen bildeten sich in diesem Stadium bereits Ausflusstrakt (OFT) und rechter Ventrikel (RV) rechtsseitig zum linken Ventrikel aus, während der Einflusstrakt (IFT) durch die Windung des Herzens dorsal zum linken Ventrikel zu liegen kam (Abb.9E, G). In MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen konnte zu diesem Zeitpunkt ein verbreitertes Herzrohr mit einem stark verkürzten Ausflusstrakt und rechter Ventrikel detektiert werden (gekennzeichnet in In-Situ-Hybridisierungen für *Nkx2-5* in Abb.9E, F). Die Struktur der mutanten Herzen im 8-Somitenstadium sowie zu späteren Entwicklungsstadien wies große Ähnlichkeit mit der Herzstruktur im Herzrohrstadium auf (vgl. zwischen Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Sagitalschnitten in Abb.9D und H).

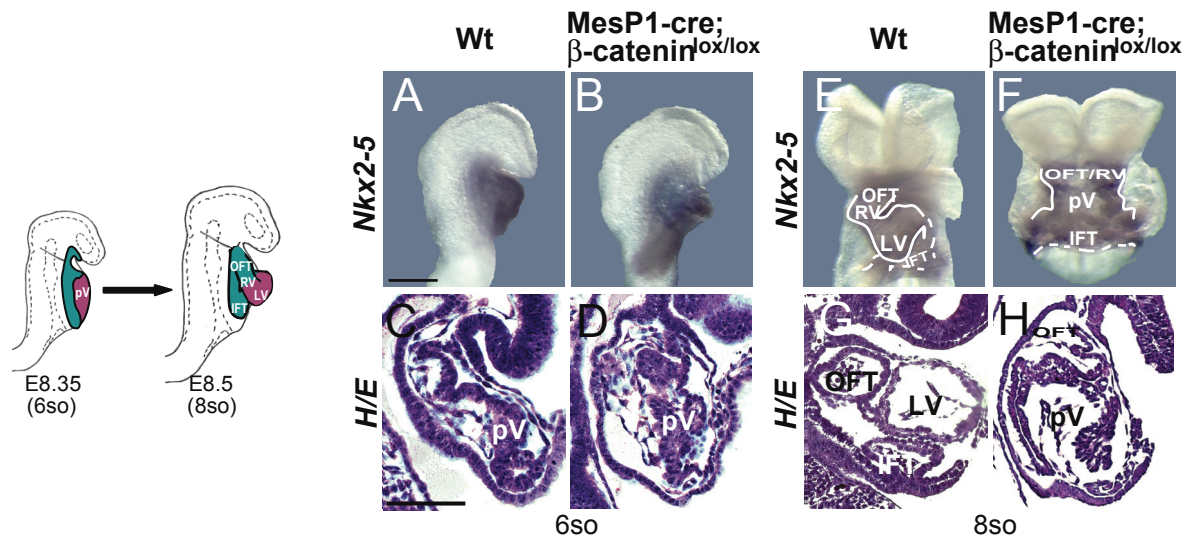


Abb. 9: Phänotypen der Wildtyp- und *MesP1-cre; β-Catenin^{lox/lox}*-Embryonen an E8.35 und E8.5. (A-H) In-Situ-Hybridisierungen für *Nkx2-5* in wildtypischen (A, E) und *MesP1-cre; β-Catenin^{lox/lox}*-Embryonen (B, F) im Herzrohr- (A,B) und Herzwindungsstadium (E, F). (C, D, G, H) Hämatoxilin/Eosin-gefärbte Sagittalschnitte durch Herzen im 6- und 8- Somitenstadium. Das äußere Herzerscheinungsbild sowie histologische Färbungen zeigen den Verlust der rechtsgerichteten Herzwindung im 8-Somitenstadium von *MesP1-cre; β-Catenin^{lox/lox}*-Embryonen (vgl. zwischen E, G mit F, H). Maßstab: 100µm (A, B, E, F), 50µm (C, D, G, H).

Die Entwicklung des ersten Herzfeldes, d.h. primitiver Ventrikel und partieller Herzeinflusstrakt, wurde mittels In-Situ-Hybridisierungen für *Tbx5* und *eHand* untersucht. In-Situ-Hybridisierungen für *Tbx5*²⁶⁰ zeigten eine mit Wildtypen vergleichbare Expression im Einflusstrakt und im caudalen primitiven Ventrikel in Herzen von *MesP1-cre; β-Catenin^{lox/lox}*-Embryonen (Abb.10A-C). Die Expression von *eHand*²⁵⁴ im gesamten primitiven Ventrikel mutanter Embryonen wies weiterhin auf einen stark verkürzten Ausflusstrakt sowie rechten Ventrikel hin (Abb.10D, E). Eine essentielle Rolle von *β-Catenin* in der Entwicklung des ersten Herzfeldes scheint aufgrund der getesteten Expression erster Herzfeldgene sowie der Entstehung und Struktur erster Herzfeldderivate (z.B. primitiver Ventrikel) ausgeschlossen zu sein.

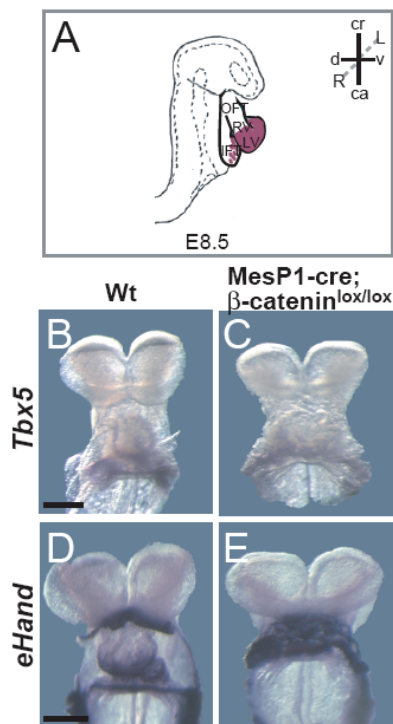


Abb. 10: Der Verlust von β -Catenin in MesP1-cre-exprimierenden Zellen zeigt keine Veränderung in der Expression von Genen des ersten Herzfeldes. (A) In der schematischen Darstellung eines Mausembryos wird das erste Herzfeld (rot) im sich windenden Herzen an E8.5 hervorgehoben. (B-E) In-Situ-Hybridisierungen für spezifische Gene des ersten Herzfeldes im 7-Somitenstadium zeigen die Expression von *Tbx5* in den Atrien (B, C) und die verbreiterte Expression von *eHand* (D, E) im primitiven Ventrikel von MesP1-cre; β -catenin^{lox/lox}-Embryonen. Ca, caudal; cr, cranial; d, dorsal; L, links; R, rechts; v, ventral. Maßstab B, D: 100 μ m.

Um die Ursache für das veränderte Herzerscheinungsbild (Verlust der rechtsgerichteten Windung sowie verkürzter Ausflusstrakt und rechter Ventrikel) in mutanten Embryonen festzustellen, wurde die Expression von spezifischen Genen der Links/Rechtsachse und des zweiten Herzfeldes zwischen E8.0-8.5 untersucht. Die Links/Rechtsachse wird im Gegensatz zur Antero/Posterioren- und Dorso/Ventralachse im sich entwickelnden Embryo erst nach Beginn der Gastrulation ausgebildet²¹⁹. So sind während der frühen Embryonalentwicklung Kopf-, Herz- und Schwanzstrukturen symmetrisch zur Mittellinie des Embryos ausgebildet. Das erste Anzeichen der Links/Rechts-Asymmetrie ist die rechtsgerichtete Windung des linearen Herzrohres. Die Links/Rechtsachse wird durch die linksseitige Expression von Tgf- β -verwandten Signalmolekülen, Nodal und Lefty1/2, festgelegt, welche die linksseitige Expression des Transkriptionsfaktors Pitx2c kontrollieren^{219;224-226;232;313;333}. Während die Expression dieser Signalmoleküle ausschließlich im 0-5- Somitenstadium detektierbar ist, wird die Expression von Pitx2c

durch Nkx2 linksseitig in allen asymmetrischen Organen aufrechterhalten²³¹. Zur Überprüfung, ob der Verlust der rechtsseitigen Windung in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen auf Veränderungen in der Genexpression von *Nodal*, *Lefty1/2* oder *Pitx2c* zurückzuführen ist, wurden In-Situ-Hybridisierungen für diese Gene durchgeführt (Abb.11). *Nodal* sowie *Lefty1/2* wurden dabei im 3-5-Somitenstadium unverändert im linken lateralen Plattenmesoderm von mutanten Embryonen exprimiert (Abb.11A-H). In-Situ-Hybridisierungen für *Lefty1/2* zeigten jedoch im 3-Somitenstadium eine schwächere Expression auf der linken Seite der Mittellinie (linkes Notochord, Abb.11C, D), welche im 4-Somitenstadium anterior nur punktuell in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen erkennbar war (markiert durch Pfeile in Abb.11E,F). Weiterhin zeigten Expressionsanalysen für *Pitx2c*, im Gegensatz zum Wildtypen, die beidseitige Expression im zurückbleibenden Ausflusstrakt mutanter Embryonen (gekennzeichnet durch Sterne in Abb.11I-J1). Der frühe Verlust der *Lefty1/2*-Expression in der Mittellinie sowie die symmetrische Expression von *Pitx2c* im zurückbleibenden Ausflusstrakt in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen wies auf die Rolle von β -Catenin in der korrekten Entwicklung der Links/Rechtsachse hin und könnte den Verlust der rechtsseitigen Windung des Herzrohres erklären.

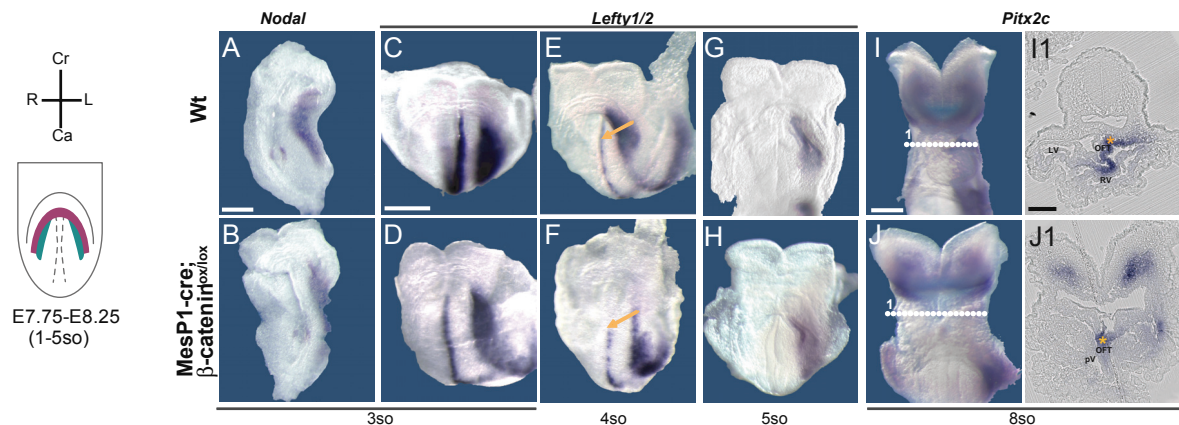


Abb. 11: Der Einfluß von β -Catenin auf die Entwicklung der Links/Rechtsachse. (A-J) In-Situ-Hybridisierungen für *Nodal*, *Lefty1/2* und *Pitx2c* in wildtypischen (A, C, E, G, I, I1) und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (B, D, F, H, J, J1) im Herzbogen- (A-H) und Herzwindungsstadium (I-J1). Während die Expression von *Nodal* im 3-Somitenstadium (A, B) unverändert ist, wird *Lefty1/2* schwächer in der Mittellinie von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen im 3-Somiten- (C, D) und 4-Somitenstadium (E, F) exprimiert. In mutanten Embryonen konnte *Pitx2c* im 8-Somitenstadium auf beiden Seiten des zurückbleibenden verkürzten Ausflusstraktes detektiert werden (I-J1). LV, linker Ventrikel; OFT, outflow tract; pV, primitiver Ventrikel; RV, rechter Ventrikel. Maßstab: 100 μ m (A, B), 100 μ m (C-H), 100 μ m (I und J; I1 und J1).

Frühere Studien zeigten, dass die Ausbildung von Ausflusstrakt und rechtem Ventrikel, durch verstärkte Proliferation und Migration von Herzvorläuferzellen des zweiten Herzfeldes in den primitiven Ventrikel ausgelöst wird^{205;212-215;218}. Die Ausbildung einer verkürzten Ausflusstraktregion in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen und die spezifische Expression des β -Catenin/TCF-Zielgenes Axin2 (s.Abb.5) in Zellen des zweiten Herzfeldes ließen auf Defekte während der Entwicklung des zweiten Herzfeldes schließen. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression von Genen untersucht, welche verschiedene Bereiche des zweiten Herzfeldes markieren und in ihrem Expressionsfeld temporal und regional überlappen. Mittels dieser weitläufigen Analyse konnte untersucht werden, ob Derivate des zweiten Herzfeldes vollständig verloren gehen oder in ihrer Morphogenese, z.B. durch Deregulation spezifischer Gene, verändert werden. Dafür wurden In-Situ-Hybridisierungen für *Isl1*, *Wnt11*, *dHand*, *Fgf8* und *Fgf10* durchgeführt (Abb.12). Während der Transkriptionsfaktor *Isl1* in allen Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes exprimiert ist und damit undifferenzierte proliferierende Zellen markiert²¹⁵, sind weitere oben angeführte Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren auch in differenzierten Zellen des zweiten Herzfeldes zu finden. So ist *Wnt11* spezifisch im Myokardium des Ausflusstraktes, *dHand* verstärkt im rechten Ventrikel und *Fgf8* und *Fgf10* in endo-, meso- und ektodermalen Zellen des zweiten Herzfeldes exprimiert^{212;255;257;327;334}. In In-Situ-Hybridisierungen für *Isl1* wurde der partielle Verlust von *Isl1*-exprimierenden Zellen im gesamten zweiten Herzfeld erkennbar (Pfeile in Abb.12A-C). Auf transversen Schnitten durch das Herz konnte *Isl1* geschwächt im splanchnischen Mesoderm von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen detektiert werden und ging vollständig im anterioren Bereich des Ausflusstraktes verloren (gekennzeichnet durch Pfeile und Pfeilköpfe in Abb.12B1-C2). Im Gegensatz dazu zeigten Expressionsanalysen für *Wnt11*, *dHand*, *Fgf8* und *Fgf10* in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen eine zum Wildtypen vergleichbare Expression (Abb.12D-K). Unterschiede zwischen wildtypischen und mutanten Embryonen konnten für *Wnt11* und *dHand* ausschließlich in der Form und Größe von Ausflusstrakt und rechtem Ventrikel detektiert werden (Abb.12D-G2). Diese Ergebnisse zeigen, dass Zellen des zweiten Herzfeldes in Abwesenheit von β -Catenin in Myokardzellen des verkürzten Ausflusstraktes und rechten Ventrikel differenzieren können, β -Catenin jedoch für die Entwicklung von *Isl1*-exprimierenden Vorläuferzellen benötigt wird.

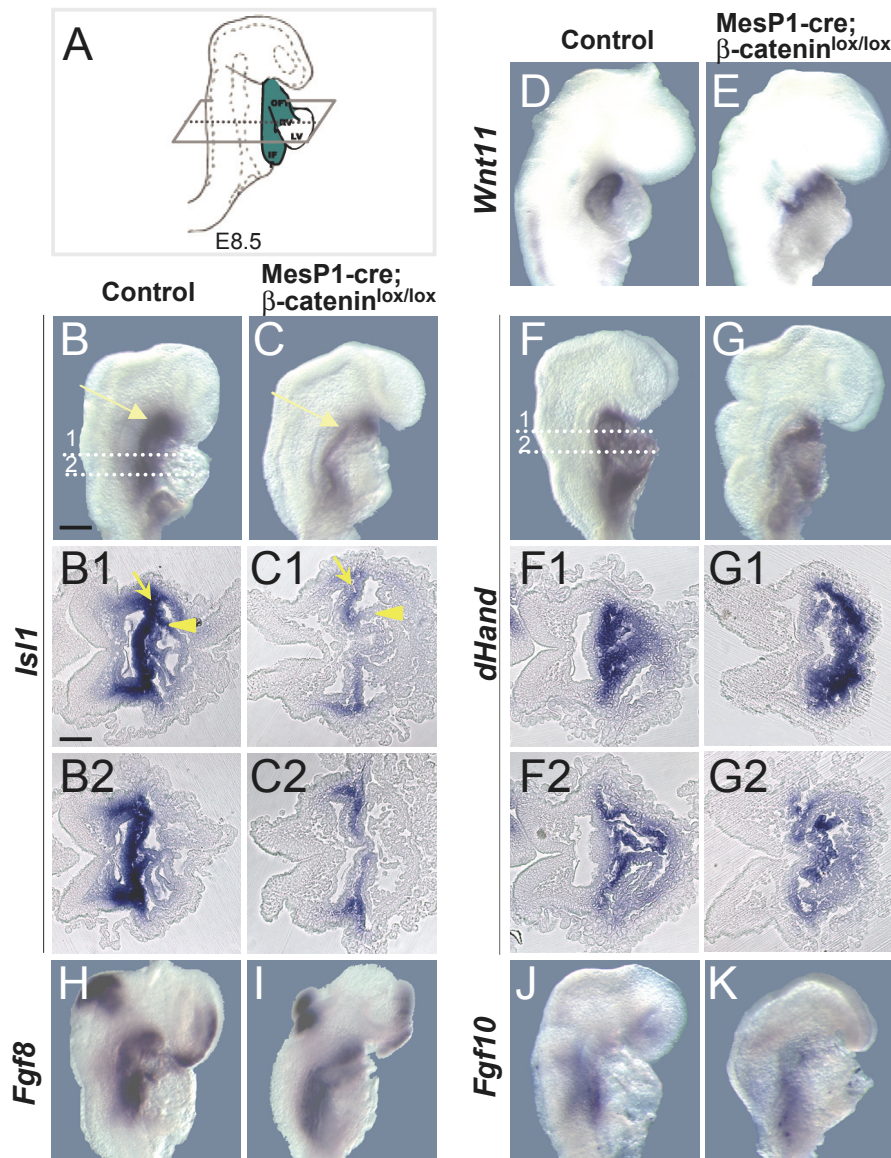


Abb. 12: Der Verlust von β -Catenin in MesP1-cre-exprimierenden Zellen verändert die Expression von *Islet1* im zweiten Herzfeld. (A) In der schematischen Darstellung eines Mausembryos wird das zweite Herzfeld (grün) im sich windenden Herzen an E8.5 hervorgehoben. (B-K) In-Situ-Hybridisierungen für Gene des zweiten Herzfeldes zeigen die Expression von *Islet1*, *dHand*, *Fgf8* und *Fgf10* in wildtypischen (B, F, H, J) und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (C, G, I, K) im 8-Somitenstadium und für *Wnt11* (vgl. zwischen Wildtyp in D und Mutant in E) im 10-Somitenstadium. (B-C2, F-G2) Transverse Schnitte zeigen die Expressionen von *Islet1* (B, C) und *dHand* (F, G) in zwei Schnittebenen in wildtypischen (gekennzeichnet mittels gestrichelten Linien in B und F) und mutanten Embryonen (C, G). (B1, C1, F1, G1) Schnittebene durch die Ausflusstraktregion. (B2, C2, F2, G2) Schnittebene durch splanchnisches Mesoderm, rechten und linken Ventrikel. Pfeile und Pfeilköpfe in In-Situ-Hybridisierungen für *Islet1* zeigen die verminderte Expression im splanchnischen Mesoderm (Pfeil) und verkürzten Ausflusstrakt (Pfeilkopf) von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (vgl. B1 mit C1). Maßstab: 100 μ m (B-K), 100 μ m (B1-G2).

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges verhindert die Bildung des Herzrohres

Um auch die Funktion von konstitutiv aktivem β -Catenin während der frühen Herzmesodermentwicklung zu studieren, wurden aktivierende β -Catenin-Mutationen in MesP1-exprimierende Zellen eingeführt. Durch diese Mutation wird stabiles β -Catenin erzeugt, welchem das N-terminale Phosphorylierungsmotiv fehlt und somit direkt in den Zellkern transloziert werden kann, um dort die Transkription von Wnt/ β -Catenin-Zielgenen zu aktivieren^{35-37;77;105;326}. In Immunofluoreszenz-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass β -Catenin verstärkt im Zellkern von ersten und zweiten Herzfeldzellen in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen exprimiert wird (vgl. Abb.7F1, H1). Weiterhin zeigten In-Situ-Hybridisierungen für das gut charakterisierte β -Catenin/TCF-Zielgen Axin2, dessen Überexpression im Herzbogen von mutanten Embryonen (Abb.13A, B). Diese Ergebnisse beweisen, dass durch die eingeführte aktivierende β -Catenin-Mutation, der β -Catenin/LEF/TCF-Signaltransduktionsweg in mesodermalen Herzvorläuferzellen konstitutiv aktiviert wird. MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen waren bereits an E9.0 nekrotisch (s.Tab.2). Zur Analyse der Entwicklung der Herzregion von MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+} Embryonen wurden deshalb In-Situ-Hybridisierungen für Gene des ersten und zweiten Herzfeldes zwischen E8.0-E8.5 (0-8 Somiten) durchgeführt. Das Erscheinungsbild des Herzbogens in mutanten Embryonen war analog mit wildtypischen Embryonen; sowohl *Nkx2-5* und *Gata4*³³⁵ als auch Gene spezifisch für das erste Herzfeld (z.B. *eHand*, *Tbx5*) wurden vergleichbar exprimiert (Abb.13C-F und nicht gezeigte Daten). Im Gegensatz dazu zeigten In-Situ-Hybridisierungen für *Isll* die verstärkte Expression im Herzbogenstadium (Abb.13G, H und Abb.14G, I). Während in wildtypischen Embryonen im 8-Somitenstadium die rechtsgerichtete Herzwindung begann, blieben in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen zwei Cluster differenzierter Kardiomyozyten zurück (vgl. In-Situ-Hybridisierungen für *MLC2a* Abb.13I, J). Die Expression von *Nkx2-5* und *Mef2c* konnte in mutanten Embryonen im Herzwindungsstadium in verstreuten punktuellen Bereichen in der Herzregion und im lateralen Plattenmesoderm detektiert werden, während *Isll* im gesamten breiten Feld unterhalb der Kopfreion erkennbar war (Abb.13K-P). Die hier gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Migration und Fusionierung beider Herzfelder sowie die Differenzierung in Kardiomyozyten des Herzrohres durch die

konstitutive Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in mesodermalen Herzvorläuferzellen gestört wird.

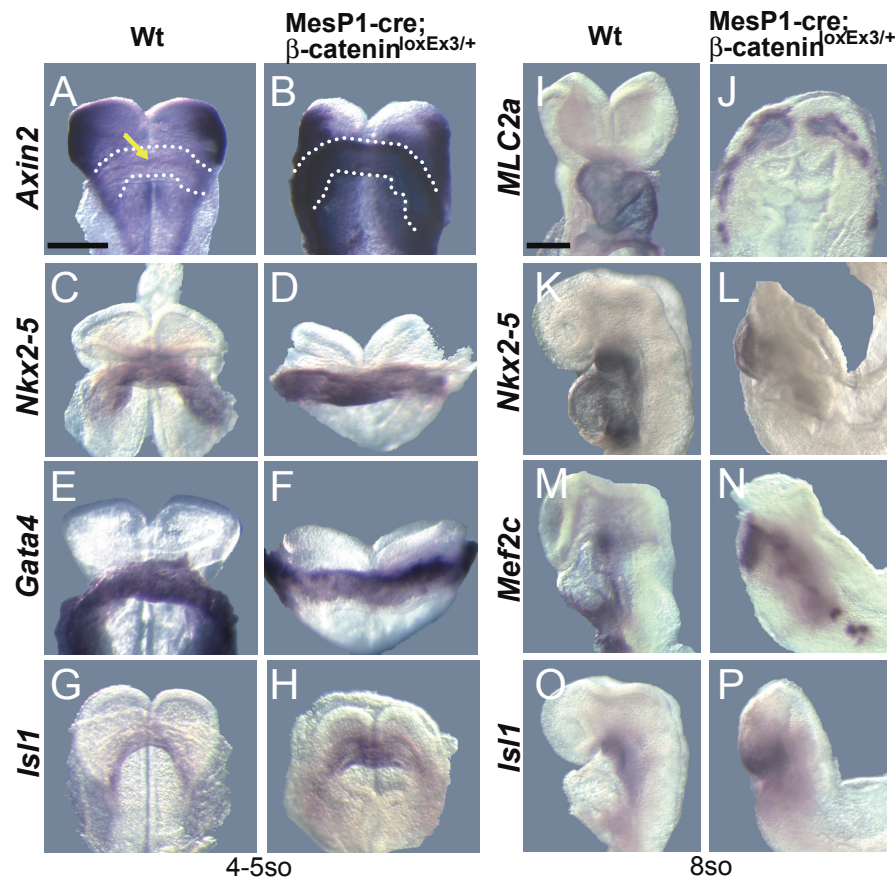


Abb. 13: Die anhaltende Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in MesP1-cre-exprimierenden Zellen verhindert die Bildung eines linearen Herzrohres. (A-P) In-Situ-Hybridisierungen für *Axin2*, *Nkx2-5*, *Gata4*, *Isl1*, *MLC2a* und *Mef2c* in wildtypischen (A, C, E, G, I, K, M, O) und MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen (B, D, F, H, J, L, N, P) im 4-5-Somitenstadium (A-H) und 8-Somitenstadium (I-P). Die Bildung eines linearen sich windenden Herzrohres ist in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen vollständig unterbunden (vgl. zwischen I und J). Maßstab: 100 μ m (A-H), 100 μ m (I-P).

Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg kontrolliert die Expression von *Bmp4* im sekundären Herzfeld

Expressionsanalysen in mutanten Embryonen mit aktivierenden und inaktivierenden β -Catenin-Mutationen in mesodermalen Herzvorläuferzellen zeigten die Veränderung der *Isl1*-Expression im sich formenden Herzrohr (MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}) bzw. Herzwindungsstadium (MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}). Der Transkriptionsfaktor *Isl1* wird in allen undifferenzierten proliferierenden Herzvorläuferzellen des zweiten Herzfeldes exprimiert²¹⁵. In der Studie von Cai et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass der konventionelle Verlust von *Isl1* in der Maus zur Verkürzung der Herzausflusstraktregion

sowie zum Verlust des rechten Ventrikels führt. Weiterhin war die Anzahl von Herzvorläuferzellen des zweiten Herzfeldes in diesen Mäusen stark reduziert und die Expression von Bmp und Fgf Liganden (*Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp6*, *Bmp7*, *Fgf4*, *Fgf8* und *Fgf10*) in den verbleibenden Herzvorläuferzellen stark reprimiert bzw. ging vollständig verloren. Die Fehlbildung der Herzausflusstraktregion sowie der Verlust des rechten Ventrikels in *Isl1*-Nullmutanten wurden auf die verminderte Proliferation und Migration von verbleibenden zweiten Herzfeldvorläuferzellen in das Herzrohr zurückgeführt. Die Ähnlichkeit im äußeren Erscheinungsbild von *Isl1*-Nullmutanten und *MesP1*-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen lenkte zur Fragestellung, ob die verminderte Expression von *Isl1* in Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes von inaktivierenden β -Catenin-Mutanten zum Verlust von Bmp- und Fgf-Liganden führt und die Proliferation sowie Migration beeinflusst. Im vorangegangenen Kapitel zum Phänotyp von *MesP1*-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen wurde bereits gezeigt, dass *Fgf8* und *Fgf10* unverändert in Zellen des zweiten Herzfeldes exprimiert werden. Deshalb wurde im Folgenden die Expression von Bmp Liganden in β -Catenin-Mutanten überprüft (Abb.14). In In-Situ-Hybridisierungen für *Bmp4* wurde der vollständige Verlust von *Bmp4* im Herzbogen- und Herzrohrstadium in zweiten Herzfeldzellen von *MesP1*-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen und die verstärkte Expression in *MesP1*-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen detektiert (Abb.14A-F, L, M). Transverse Schnitte durch das Herzrohr zeigten im Gegensatz zu *Bmp4*, dass *Isl1* zu diesem Entwicklungszeitpunkt vergleichbar im zweiten Herzfeld von wildtypischen und *MesP1*-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen exprimiert wird und verstärkt in *MesP1*-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen erkennbar ist (vgl. zwischen Abb.14D1-F1 und G-I). *Bmp4* wurde bereits in früheren Studien als direktes Zielgen der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung in unterschiedlichen Organanlagen und Geweben beschrieben^{92;105;336} und konnte in Huhnembryonen die Expression von *Isl1* in Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes regulieren³³⁷. Die Expressionen anderer Bmp-Liganden, *Bmp2* und *Bmp7*, erschienen verstärkt (Pfeile in Abb.14J, K) bzw. schwächer im verkürzten Herzausflusstrakt und im splanchnischen Mesoderm (Pfeile und Pfeilköpfe in In-Situ-Hybridisierungen für *Bmp7*, Abb.14N-O1) von *MesP1*-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen im 8-Somitenstadium. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten auf *Bmp4* als Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes hin.

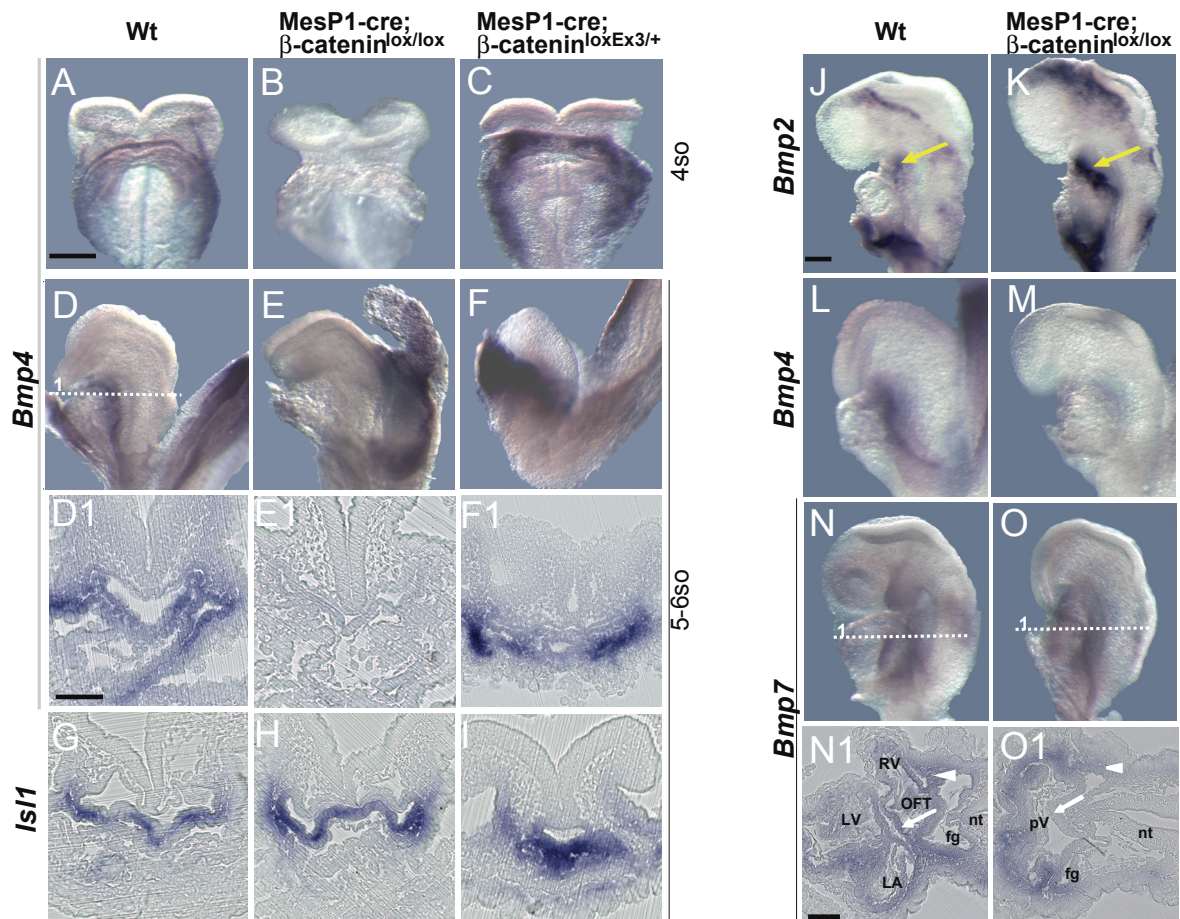


Abb. 14: Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg beeinflusst die Expression von *Bmp4* im zweiten Herzfeld. (A-F1) In-Situ-Hybridisierungen für *Bmp4* in wildtypischen (A, D, D1), MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}- (B, E, E1) und MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen (C, F, F1) sowie in transversen Schnitten (D1-F1) zeigen den Verlust der *Bmp4*-Expression in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}- und die verstärkte Expression in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen. (G-I) Transverse Schnitte von Isl1-In-Situ-gefärbten Embryonen zeigen einen vergleichbaren Anteil von Isl1-exprimierenden Zellen in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (vgl. zwischen G und H) und die verstärkte Expression in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen (vgl. zwischen G und I). (J-O1) In-Situ-Hybridisierungen für *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* im 8-Somitenstadium von wildtypischen (J, L, N, N1) und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (K, M, O, O1). Neben dem vollständigen Verlust der *Bmp4*-Expression kann eine verminderte *Bmp7*-Expression sowie die verstärkte Expression von *Bmp2* in Zellen des anterioren zweiten Herzfeldes detektiert werden. Maßstab: 100 μ m (A-F), 100 μ m (D1-I), 100 μ m (J-O), 100 μ m (N1, O1).

Des Weiteren wurde die Proliferation und Apoptose von Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes im Herzbogen- und Herzrohrstadium von β -Catenin-Mutanten überprüft. Dafür wurde mittels Immunofluoreszenz-Analyse der Anteil phospho-Histon H3 (pHH3)- bzw. TUNEL-positiver Zellen in Isl1-positiven (zweites Herzfeld, SHF) und Isl1-negativen (erstes Herzfeld, FHF) Herzzellen bestimmt (Abb.15). Die Analyse beschränkte sich für MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen auf das Herzbogenstadium, da die Ausbildung des Herzrohres in diesen Embryonen unterbunden und somit kein Vergleich

mit wildtypischen Herzen im Herzwindungsstadium möglich war. In MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen konnten im Herzbogenstadium weniger pHH3+ Zellen detektiert werden, welche zusätzlich Isl1 exprimieren (orange/gelb durch die Überlagerung grüner und roter Fluoreszenz in Abb.15A-C). Der Anteil pHH3- und Isl1-koexprimierender Zellen erschien in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen ähnlich (Abb.15B, D). Während im Herzbogenstadium eine vergleichbare Anzahl rot-fluoreszierender Isl1-exprimierender Zellen in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen erkennbar war, wurde im Herzrohrstadium ein stark verminderter Anteil detektiert (Abb.15E-G). Die Verteilung und der Anteil von Isl1-Protein sind vergleichbar mit den zuvor gezeigten *Isl1*-mRNA-Daten (s.Abb.12B-C2, Abb.14G-I).

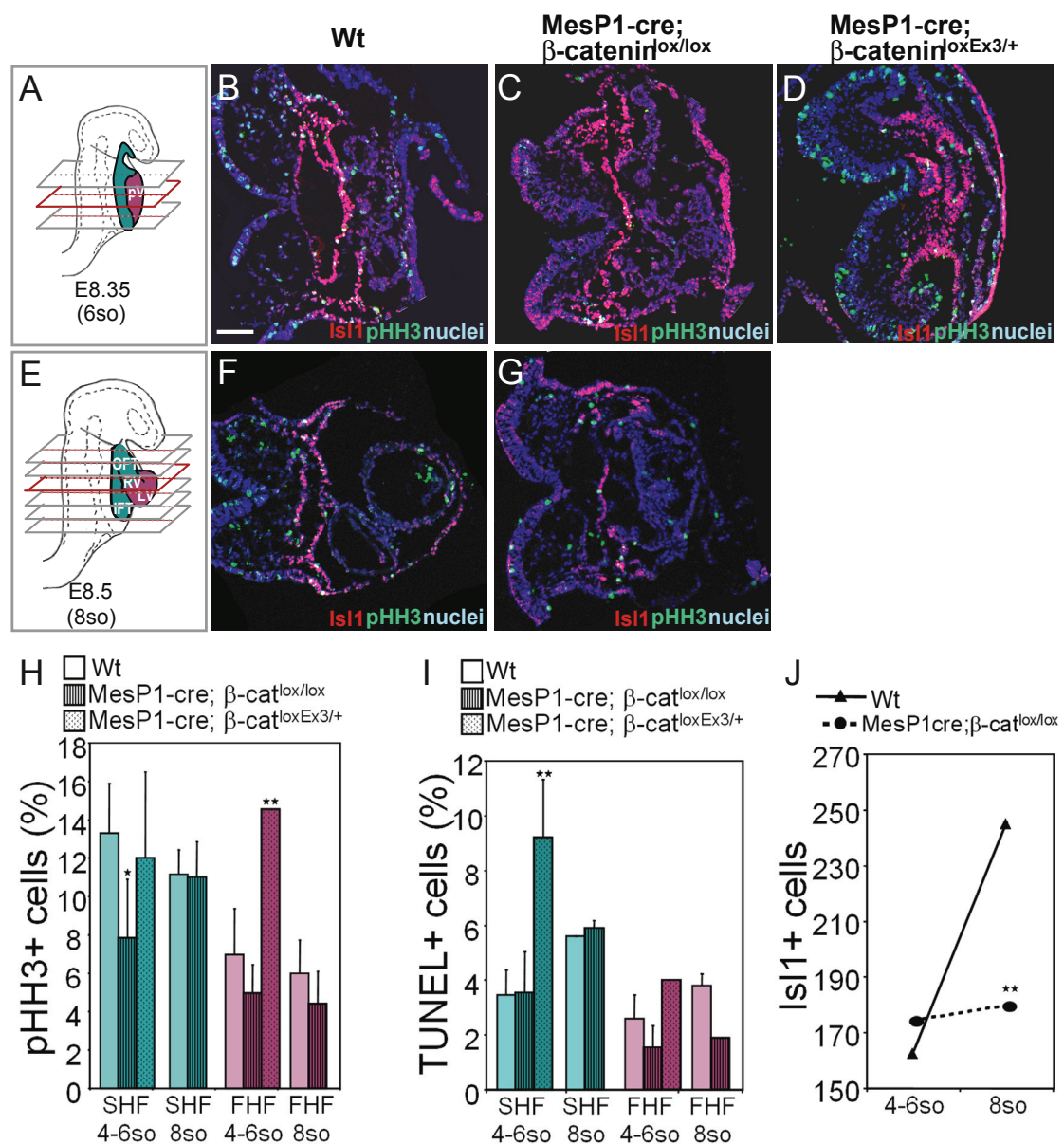


Abb. 15: Der Verlust von β -Catenin in MesP1-cre-exprimierenden Zellen vermindert die Zellproliferationsrate im zweiten Herzfeld. (A, E) In der schematischen Darstellung von Mausembryonen

werden die untersuchten Schnittebenen im 6- und 8-Somitenstadium sowie das erste (rot) und zweite Herzfeld (grün) hervorgehoben. (B-G) Immunfluoreszenz-Analyse für Phospho-Histon-H3 (pHH3, grün) und Islet1 (Isl1, rot; Kernfärbung TOTO, blau) auf der in A und E rot markierten Schnittebene in wildtypischen (B, F), MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}- (C, G) und MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen (D) im 4-6-Somiten- (A-D) und 8-Somitenstadium (E-G). Der Anteil pHH3- und Isl1-koexprimierender Zellen im 6-Somitenstadium von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen ist stark reduziert, während der Anteil von Isl1 exprimierender Zellen (rot) vergleichbar ist (vgl. zwischen B und C). Immunfluoreszenzen im 8-Somitenstadium (F, G) zeigen die verminderte Expression von Isl1 in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen. (H, I) Quantifizierung von Proliferation und Apoptose in wildtypischen (durchgängig schwachgefärbte Balken), MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}- (gestreift dunkelgefärbte Balken) und MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen (gepunktete mittelgefärbte Balken) mittels Zählung von pHH3- bzw. TUNEL-positiven Zellkernen im ersten (rot) und zweiten Herzfeld (grün). Signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und mutanten Embryonen wurden mit * ($P < 0.05$) oder ** ($P \leq 0.01$) gekennzeichnet. (J) Durchschnittliche Zellzahl Isl1-exprimierender Zellen pro Schnittebene im 4-6-Somiten- und 8-Somitenstadium von wildtypischen (durchgezogene Linie) und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen (gepunktete Linie). Maßstab in B: 50 μ m.

Für die Ermittlung der Proliferations- und Apoptoserate wurden für jedes Entwicklungsstadium jeweils drei bis sechs transverse Schnittebenen (dargestellt in Schemata in Abb.15A, E) von je drei wildtypischen und mutanten β -Catenin-Embryonen zur Auszählung von pHH3- bzw. TUNEL-positiven Zellen im ersten und zweiten Herzfeld verwendet. Dabei wurde in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen ein signifikanter Verlust von 41% ($P = 0,048$) pHH3-Isl1-koexprimierender Zellen im Herzbogenstadium detektiert, während der Anteil im Herzwindungsstadium vergleichbar mit dem wildtypischer Embryonen war (Abb.15H). Die Proliferation erster Herzfeldzellen in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen war in beiden Entwicklungsstadien geringfügig vermindert. In MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen wurde kein Unterschied in der Proliferation von zweiten Herzfeldzellen erkennbar, jedoch konnte ein signifikanter 2,1-facher ($P = 0,001$) Anstieg in der Proliferationsrate erster Herzfeldzellen detektiert werden (Abb.15H). Die Apoptoserate in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen zeigte in Isl1-exprimierenden Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes im Herzbogen- und Herzwindungsstadium keine Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte in MesP1-cre; β -Catenin^{loxEx3/+}-Embryonen ein signifikanter 2,7-facher Anstieg ($P = 0,007$) apoptotischer Isl1-exprimierender Zellen beobachtet werden (Abb.15I). Die Anzahl von Isl1-exprimierenden Zellen wurde in wildtypischen und MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen im Herzbogen- und Herzwindungsstadium gegenübergestellt (Abb.15J). Dabei wurden im wildtypischen Herzbogen durchschnittlich 163,5 Isl1-exprimierende Zellen und im Herzbogen von MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen im Mittel 174,5 Zellen gezählt. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl Isl1-exprimierender Zellen im Herzwindungsstadium von

wildtypischen Embryonen um 33,5% ($P=0,01$) auf durchschnittlich 246 Zellen an, während sich die Zellzahl Isl1-positiver Zellen in MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen geringfügig um 3% veränderte. Der Anstieg in der Zellzahl Isl1-exprimierender Vorläuferzellen zwischen Herzbogen- und Herzwindungsstadium korreliert mit der verstärkten Proliferation dieser Zellen im Herzbogenstadium von wildtypischen Embryonen im Gegensatz zu MesP1-cre; β -Catenin^{lox/lox}-Embryonen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg Isl1 nicht transkriptionell, sondern vorzugsweise die Proliferation von Isl1-positiven Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes reguliert.

Diskussion

Die Bmp- und Wnt-Signalwege sind essentiell für die Bildung früh-embryonaler Herzstrukturen

Die Funktion der Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege in der Entwicklung des Herzens wurde bereits in Drosophila-, Frosch- und Huhnembryonen untersucht. In diesen In Vivo- und Ex Vivo-Studien wurde der Bmp-Signalweg als positiver Regulator und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg als positiver sowie negativer Regulator der frühen Herzentwicklung beschrieben^{273;274;277;279-281;298;299}. Im Gegensatz dazu konnten Arbeiten in der Maus die Funktion beider Signalwege in der Bildung und Spezifizierung von Herzmesoderm in das früh-embryonale Herz nicht entschlüsseln. Während konventionelle Nullmutanten bereits vor Bildung des mesodermalen Keimblattes und damit vor Beginn der Spezifizierung in Herzmesoderm embryonal lethal waren, zeigten konditionelle Mausmutanten spät-embryonale Ausflusstraktdefekte^{79;82;180;181;271;287-293;295-297;306} (Tab.1). Des Weiteren blieb in diesen Studien bisher ungeklärt, welche Funktionen die beiden Signalwege auf die Bildung, Aufrechterhaltung und Spezifizierung der verschiedenen Herzvorläuferpopulationen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von inaktivierenden und aktivierenden Mutationen im Bmp-Rezeptor Ia und in β -Catenin in mesodermalen Herzvorläuferzellen gezeigt, dass die Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des ersten und zweiten Herzfeldes haben (Abb.16). Dafür wurde die transgene cre-Rekombinase unter der Kontrolle des MesP1-Promotors verwendet, welche

bereits zu Beginn der Gastrulation (E6.5) in mesodermalen Herzvorläuferzellen aktiv ist, aus denen Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes hervorgehen²⁰⁸. Die Einführung konditioneller Mutationen in Genen mittels MesP1-cre erfolgt damit nach Spezifizierung von Mesoderm in Herzmesodermvorläufer jedoch, vor der Spezifizierung in Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes. Die Aktivierung der cre-Rekombinase findet somit eher statt als bei jeder anderen bisher untersuchten herzspezifischen cre-Rekombinasen (z.B. Nkx2-5- oder α MHC-cre), welche an E7.5 oder später angeschaltet werden^{209,338,339}. Die MesP1-cre-induzierte inaktivierende Mutation im BmpRIa resultiert in vollständigem Verlust der ersten Herzfeldderivate, d.h. weder Herzbogen noch primitiver Ventrikel konnten gebildet werden, einhergehend mit dem völligen Expressionsverlust spezifischer erster Herzfeldgene. Im Gegensatz dazu bildeten sich das erste Herzfeld und dessen Derivate korrekt in Mäusen mit inaktivierender β -Catenin-Mutation, während die Entwicklung des zweiten Herzfeldes gestört war, z.B. die rechtsgerichtete Windung des linearen Herzrohres sowie Formierung des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels. Aktivierende β -Catenin-Mutationen resultieren hingegen im Verlust der Fusionierung beider Herzfelder zum linearen Herzrohr. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg während der Entwicklung früh-embryonaler Herzstrukturen der Maus präzise reguliert werden muss, damit sich ein windendes lineares Herzrohr bilden kann.

Die Rolle der BmpRIa-Signalgebung in der Spezifizierung des ersten Herzfeldes

Das konditionelle Ausschalten des Bmp-Rezeptor Ia in Herzvorläuferzellen führte zum Verlust des Herzbogens und Expressionsverlust erster Herzfeldgene, z.B. *Gata6*, *Tbx5* und *eHand* (Abb.16, Abb.17). Damit konnte erstmalig in Mäusen die essentielle Funktion des Bmp-Signalweges für mesodermale Vorläuferzellen sowie für die Entwicklung erster Herzfeldvorläuferzellen nachgewiesen werden. Ein wesentliches Gen für die Bildung und Differenzierung von Herzvorläuferzellen, *Nkx2-5*, wurde in diesen Mutanten anfangs im sich-formierenden Herzbogen detektiert, es blieb jedoch zu späteren Zeitpunkten lediglich ein kleines Feld der *Nkx2-5*-Expression zurück. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Bmp-Signalgebung über den BmpRIa wichtig ist für die Aufrechterhaltung der *Nkx2-5*-Expression, jedoch nicht für die initiale Aktivierung von *Nkx2-5*. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die frühe Spezifizierung von Mesodermzellen in mesodermale Herzvorläufer stattfinden muss, damit der Promoter von MesP1 aktiviert wird und damit

die cre-Rekombinase angeschaltet werden kann. Die *Nkx2-5*-Expression könnte so zum Zeitpunkt der Spezifizierung in Herzmesoderm prinzipiell durch den wildtypischen BmpRIa induziert werden. Die Spezifizierung von Mesoderm in Herzmesoderm findet allerdings bereits an E6.5 statt, und Herzmesodermzellen exprimieren *Nkx2-5* erst ab E7.25 im sich formenden Herzbogen. Da die *Nkx2-5*-Expression in BmpRIa-Mutanten erst nach Fusionierung beider mesodermaler Flügel zum Herzbogen verstärkt abnimmt, an E8.0, scheint die Induktion von *Nkx2-5* nicht über den BmpRIa-Signalweg reguliert zu werden, jedoch die Aufrechterhaltung der *Nkx2-5*-Expression. Es bleibt allerdings die Fragestellung, ob die Abnahme der *Nkx2-5*-Expression z.B. auch auf verstärkten Zelltod und/ oder verminderte Proliferation *Nkx2-5*-exprimierender Zellen zurückzuführen sein könnte. Weiterhin ist das phänotypische Erscheinungsbild der BmpRIa-Mutanten stärker als das von konventionellen *Nkx2-5*-Nullmutanten, so dass der hier ermittelte Phänotyp nicht alleinig auf Veränderungen der *Nkx2-5*-Expression zurückzuführen ist^{308;309}. Möglicherweise ist der kombinierte Verlust von *Gata*-Faktoren und *Nkx2-5*, deren direkte Regulation durch die Bmp-Signalgebung bereits beschrieben wurde, in BmpRIa-Mutanten ausschlaggebend²⁴⁹⁻²⁵². Unterstützt werden unsere Ergebnisse durch frühere Studien in Frosch- und Huhnembryonen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Injektion dominant-negativer BmpRIa-DNA oder BmpRII-DNA in Ein- oder Zweizellstadien von *Xenopus*-Embryonen keinen Effekt auf die Expression von *Nkx2-5* im fusionierenden Herzprimordium hat, jedoch nach Fusionierung und vor Differenzierung in Kardiomyozyten verloren geht²⁷⁸. In Huhnembryonen induzierte die ektopische Expression von Bmp-Rezeptoren oder Bmp2/4-Liganden die ektopische *Nkx2-5*-Expression, und schlagende Kardiomyozyten konnten anschließend gebildet werden²⁷⁷. Andererseits hemmte die ektopische Noggin-Expression In Vivo die Expression von *Gata4*, *Nkx2-5* sowie *eHand* und die Differenzierung in Kardiomyozyten^{277;340}. Spezifischere Untersuchungen in Bezug auf die verschiedenen Vorläuferpopulationen wurden damals nicht durchgeführt, da zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichungen nicht zwischen ersten und zweiten Herzvorläuferpopulationen unterschieden wurde. Spätere Studien in der Maus zeigten, dass *Nkx2-5* für die Aktivierung der *eHand*-Expression im ersten Herzfeldderivat (linker Ventrikel) entscheidend ist^{205;341}. *Nkx2-5* wird jedoch auch im zweiten Herzfeld exprimiert und kontrolliert dort die Differenzierung in Kardiomyozyten des Ausflusstrakes, rechten Ventrikels und Einflusstrakes^{248;308;309;341}. So könnte der geringe Gehalt zurückbleibender *Nkx2-5*-Expression in den hier untersuchten BmpRIa-Mutanten zu späteren Entwicklungsstadien auch im zweiten Herzfeld exprimiert sein. Diese Hypothese

wird unterstützt dadurch, dass spezifische zweite Herzfeldgene weiterhin detektierbar sind, z.B. *Fgf8* und *Isl1*, während das Expressionsmuster von *MLC2a*, einem Gen welches in differenzierten Kardiomyozyten zu finden ist, verändert ist³³². So geht in BmpRIa-Mutanten die frühe Differenzierung in Kardiomyozyten verloren, welche normalerweise in ersten Herzfeldzellen stattfindet, während sich kleine Felder differenzierter *MLC2a*-exprimierender Kardiomyozyten bilden, sobald zweite Herzfeldzellen beginnen zu differenzieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Bmp-Signalweg im linearen Herzrohrstadium in Zellen des ersten sowie zweiten Herzfeldes aktiviert ist und somit eine Funktion in der Entwicklung beider Herzfelder hat (Abb.5). Da jedoch die Defekte in der Spezifizierung erster Herzfeldvorläufer in den BmpRIa-Mutanten so dominant waren, konnte eine Funktion des BmpRIa auf die Entwicklung des zweiten Herzfeldes nicht nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Herzvorläuferzellen in Abwesenheit der BmpRIa-Signalgebung keine koordinierten herzspezifischen Zellwege einschlagen können, d.h. *Nkx2-5* spezifisch für frühe Herzvorläuferzellen wird initial exprimiert, während nur wenige Zellen in Kardiomyozyten differenzieren können und kein Herz gebildet wird. Die gewonnenen Ergebnisse stimmen mit früheren Daten aus Frosch- und Huhnembryonen überein und zeigen in der Maus erstmalig vorrangig die essentielle Funktion des Bmp-Signalweges auf die Spezifizierung erster Herzfeldzellen in der Bildung früh-embryonaler Herzstrukturen, während Defekte in zweiten Herzvorläuferzellen nicht genauer untersucht werden konnten.

Über die verschiedenen Stadien der Herzentwicklung hinweg scheint die Aktivierung des Bmp-Signalweges zeitlich und regional wichtig zu sein, um die Bildung, Aufrechterhaltung und Spezifizierung von mesodermalen Vorläuferzellen zu kontrollieren (s.Abb.16). So ist die Freisetzung von BmpRIa-spezifischen Bmp-Liganden aus dem extraembryonalen Ektoderm entscheidend für die Bildung des mesodermalen Keimblattes¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. In mesodermalen Herzvorläuferzellen, ab E7.5, kontrolliert die BmpRIa-Signalgebung die Aufrechterhaltung von *Nkx2-5*-exprimierenden Zellen und deren Differenzierung in Kardiomyozyten vorrangig in ersten Herzfeldzellen und die Bildung erster Herzfeldderivate. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigte eine im gleichen Jahr erschienene Studie, dass das konditionelle Ausschalten von Smad1 durch die MesP1-cre-Rekombinase in einem späteren Phänotyp resultiert³⁰⁹. Die gesteigerte Proliferation zweiter Herzfeldvorläuferzellen führte in diesen Mutanten zur Verlängerung des Ausflusstraktes. Heterozygote Doppelmutanten für Smad1 und Smad5 zeigten im

Gegensatz zu den konditionellen Smad1-Mutanten den Verlust der Herzwindung und eine Verkürzung des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels¹⁹⁵. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass über Smad1 und Smad5 unterschiedliche Zellwege eingeschlagen werden, so dass durch die verringerte Aktivierung der Bmp-Signalgebung über Smad1/5 weniger zweite Herzfeldzellen aufrechterhalten werden, während der Verlust von Smad1 die Proliferation antreibt. So zeigen transgene Smad1-Mutanten, in welchen nur das C-terminale Phosphorylierungsmotiv mutiert wurde, ein abweichendes Herzerscheinungsbild, das allerdings nicht im Detail untersucht wurde^{309;342}. Unterschiede zwischen diesen transgenen Smad1- und konditionellen Smad1-Mutanten weisen darauf hin, dass Smad1 unabhängig von der Bmp-Rezeptor-TypI-spezifischen Phosphorylierung reguliert werden kann. Der frühere und stärkere Phänotyp in unseren BmpRIa-Mutanten könnte dadurch erklärt werden, dass in Smad1-Mutanten der Verlust von Smad1 durch Smad5 kompensiert werden kann, und in heterozygoten Smad1^{-/-}/5^{-/-}-Mutanten weiterhin verminderte Bmp-Signalweiterleitung stattfinden kann. Nach E7.5 führt der Verlust der Bmp-Signalgebung über BmpRIa- oder ActRIa-Rezeptoren in differenzierenden und differenzierten Kardiomyozyten (z.B. mittels Nkx2-5- oder α MHC-cre), sowie spezifisch in Zellen des zweiten Herzfeldes (Isl1-cre) oder in Neuralleistenzellen (Wnt1-cre) zu spät-embryonalen Herzdefekten, welche zumeist auf Defekte in der Differenzierung zweiter Herzfeldzellen und Neuralleistenzellen zurückzuführen sind. So waren nach Verlust der Bmp-Signalgebung ab E7.5 Defekte in der Cushionbildung im Atrioventrikularbereich und Teilung der Ausflusstraktgefäße detektierbar, welche zumeist auf veränderte Proliferation zurückgeführt wurden (Tab.1).

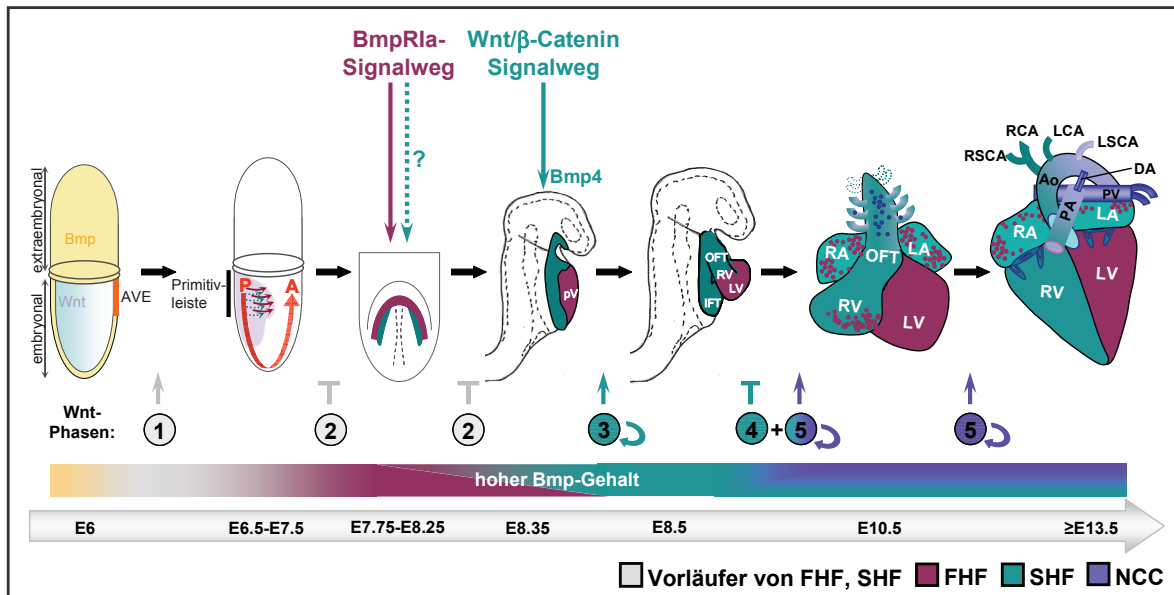


Abb. 16: Die Bmp- und Wnt/β-Catenin-Signalwege regulieren zeitlich und regional die Entwicklung des embryonalen Herzens. Schematische Darstellung von Position und Derivaten erster (rot), zweiter (grün) Herzfeldvorläuferzellen und Neuralleisten (blau) im Herzbogen-, Herzrohr-, Herwindungsstadium sowie zum Zeitpunkt der Cushionbildung und Teilung der Ausflusstraktgefäße. Die Bmp-Signalgebung (rot) hat starken Einfluss auf die Bildung erster Herzfeldderivate (die Funktion im zweiten Herzfeld konnte nicht untersucht werden), während die β-Catenin-Signalgebung (grün) die Entwicklung des zweiten Herzfeldes kontrolliert. Es existieren also mindestens fünf verschiedene Phasen des Wnt-Signalweges während der embryonalen Herzentwicklung. Balken und Pfeile zeigen wo und zu welchen Zeitpunkten der Wnt/β-Catenin-Signalweg inhibiert oder aktiviert werden muss, um die Entwicklung des embryonalen Herzens voranzutreiben. Mittels eines farblich-markierten Balkens wurde gezeigt, wann und in welchen Vorläuferzellen ein hoher BmpRIa-spezifischer Bmp-Gehalt detektiert wurde. A, anterior; Ao, Aorta; AVE, anteriores viscerales Endoderm; DA, Ductus Arteriosus; IFT, inflow tract; NCC, neural crest cells; OFT, outflow tract; P, posterior; PA, Pulmonararterie; PV, Pulmonarvene; RA und LA, rechtes und linkes Atrium (Vorhof); RKA und LKA, rechte und linke Karotisarterie; RSCA und LSCA, rechte und linke Subclavianarterie; SHF, second heart field. Die Abbildung wurde modifiziert nach²⁰⁵.

Die Rolle der Wnt/β-Catenin-Signalgebung in der Entwicklung des zweiten Herzfeldes

Im Gegensatz zu BmpRIa-Mutanten führt das konditionelle Ausschalten von β-Catenin zu Herzdefekten speziell in der Entwicklung des zweiten Herzfeldes, d.h. zum Verlust der rechtsgerichteten Herzwindung, verkürztem rechten Ventrikel und Verminderung Isl1-exprimierender zweiter Herzvorläuferzellen (Abb.16). Einhergehend mit der spezifischen Expression des Wnt/β-Catenin-spezifischen Zielgenes, Axin2, ausschließlich in zweiten Herzvorläuferzellen im Herzrohrstadium konnte so erstmalig in Mäusen die essentielle Funktion von β-Catenin in mesodermalen Vorläuferzellen sowie für die Entwicklung zweiter Herzfeldvorläuferzellen nachgewiesen werden. Ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Bildung und Aufrechterhaltung zweiter Herzvorläuferzellen, Isl1, wurde in diesen Mutanten im Herzrohrstadium (E8.35) vergleichbar exprimiert,

während die Anzahl der *Isl1*-exprimierenden Zellen im Herzwindungsstadium (E8.5) signifikant reduziert war. In der früheren Studie von Cai et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass *Isl1*-exprimierende Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes entscheidend sind für die Bildung von Ausflusstrakt und rechtem Ventrikel, Regionen welche in konventionellen *Isl1*-Nullmutanten stark verkürzt sind oder vollständig verloren gehen²¹⁵. Weiterhin waren in *Isl1*-Nullmutanten die Anzahl der Herzvorläuferzellen des zweiten Herzfeldes sowie die Expression von *Fgf*- und *Bmp*-Liganden stark reduziert und es konnte die verminderte Proliferation und Migration verbleibender zweiter Herzfeldzellen in den primitiven Ventrikel des linearen Herzrohres detektiert werden. Proliferation sowie Migration zweiter Herzfeldvorläuferzellen sind essentielle Prozesse für die Bildung eines gewundenen Herzrohres und die Bildung des Ausflusstraktes sowie rechten Ventrikels. In den hier untersuchten inaktivierenden β -Catenin-Mutanten konnte die Reduktion der Anzahl *Isl1*-exprimierender Zellen auf die verminderte Proliferation dieser Zellen im Herzbogen- und Herzrohrstadium zurückgeführt werden, während die Apoptoserate unverändert blieb. Neben der geringeren Anzahl *Isl1*-exprimierender zweiter Herzfeldzellen konnte der völlige Verlust der *Bmp4*-Expression und die Verminderung der *Bmp7*-Expression im Ausflusstrakt und splanchnischen Mesoderm detektiert werden, während *Bmp2* verstärkt erschien. In der Studie von Prall et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass die verstärkte *Bmp2*-Expression in *Nkx2-5*-Nullmutanten die *Smad1* induzierte Reduktion der Zellproliferation in Zellen des zweiten Herzfeldes dirigierte³⁰⁹. *Bmp4* wurde in Huhnembryonen als positiver Regulator der *Isl1*-Expression beschrieben³³⁷ und kontrolliert in konditionellen Mausmutanten die korrekte Teilung der Ausflusstraktgefäße sowie die Cushionbildung^{288;290} (Tab.1). Außerdem wurde in Mäusen bereits gezeigt, dass *Bmp4* und *Bmp7* in der Entwicklung des Ausflusstrakts kooperieren. So führt der kombinierte Verlust von *Bmp4* und *Bmp7* (*Prx1-cre*; *Bmp4*^{fl/-}*Bmp7*^{-/-}) oder die Verminderung an *Smad1* und *Smad5* in heterozygoten *Smad1/5*-Doppelmutanten zur Verkürzung des Ausflusstraktes^{195;290}. Das phänotypische Erscheinungsbild der hier untersuchten inaktivierenden β -Catenin-Mutanten könnte demnach auf den Verlust von *Bmp4* zusammen mit der Verminderung von *Bmp7* und *Isl1*-exprimierender Zellen zurückgeführt werden. Entsprechend der ermittelten Ergebnisse in inaktivierenden β -Catenin-Mutanten konnte in konstitutiv aktivierten β -Catenin-Mutanten die Überexpression von *Bmp4* sowie *Isl1* detektiert werden. Andere Gene, welche essentiell für die Entwicklung des zweiten Herzfeldes sind, wurden in beiden Mutanten weiterhin

exprimiert und zeigen so, dass sie unabhängig von der β -Catenin-Signalgebung aktiviert werden. Der Verlust der Fusionierung beider Herzfelder zum linearen Herzrohr und Bildung zweier Felder differenzierter Kardiomyozyten in aktivierenden β -Catenin-Mutanten sowie der verkürzte rechte Ventrikel in inaktivierenden β -Catenin-Mutanten weisen darauf hin, dass die Migration von Vorläuferzellen durch die veränderte β -Catenin-Signalgebung gestört sein könnte. Migrationsdefekte könnten in aktivierenden β -Catenin-Mutanten auf den verstärkten Zelltod von Zellen des zweiten Herzfeldes und auf die Aufrechterhaltung des Vorläuferstatus erster Herzfeldzellen, durch die signifikant gesteigerte Proliferation, zurückzuführen sein. In Wildtypen nimmt der detektierbare Bmp-Gehalt im ersten Herzfeld ab, und die Differenzierung in Kardiomyozyten beginnt, während verstärkt Bmp-Liganden in Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes zu finden sind (s. Abb. 16). In neuronalen Vorläuferzellen konnte bereits gezeigt werden, dass ein zu hoher Bmp-Gehalt Apoptose auslöst während hohe Bmp-Level die Proliferation antreiben^{196;200-204;343}. Demnach könnten der gesteigerte Zelltod zweiter Herzfeldvorläufer, bei gleichbleibender Proliferationsrate, sowie die gesteigerte Proliferation erster Herzfeldzellen mit dem erhöhten *Bmp4*-Level im gesamten Herzbogen von aktivierenden β -Catenin-Mutanten zusammenhängen. Im Gegensatz dazu könnte in inaktivierenden β -Catenin-Mutanten durch Verlust von *Bmp4/7* die frühzeitige Differenzierung in Kardiomyozyten ausgelöst und damit die gerichtete Zellbewegung unterbunden werden. Ein Hinweis darauf ist die vergleichbare Gesamtzellzahl im Herzen von Mutanten und Wildtypen an E8.5, während die Zahl der *Isl1*-exprimierenden Zellen abnahm und keine Apoptosedefekte vorlagen. Um diese Migrationshypothesen zu testen, müssten Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes z.B. mittels Di-I-Markierung oder durch Kreuzungen mit transgenen *Fgf10*- oder *Isl1-LacZ*-Mäusen anfärbbar gemacht und ihr Weg sowie Differenzierungsstatus in den β -Catenin-Mutanten untersucht werden.

Des Weiteren scheint die Richtung der Herzwindung direkt oder indirekt durch β -Catenin kontrolliert zu werden, da in inaktivierenden β -Catenin-Mutanten die gerichtete Windung des linearen Herzrohres verloren geht. Unterstützt wird diese Hypothese durch den vorzeitigen Verlust der *Lefty1*-Expression in der linken Mittellinie (Notochord, Bodenplatte des Neuralrohres) und als Konsequenz daraus die Detektion bilateral-symmetrischer Expression von *Pitx2c* im verbleibenden Ausflusstrakt. β -Catenin kann jedoch mittels *MesP1-cre*-Rekombinase nicht in Zellen der Mittellinie eliminiert werden. Es könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass durch den Verlust von β -Catenin in den

auslaufenden Herzbogenflügeln (laterales Plattenmesoderm) durch Wnt/ β -Catenin z.B. transkriptionell-kontrollierte Signalmoleküle, wie Tgf- β /Bmp, nicht sezerniert werden können, welche für die Expression und Aufrechterhaltung von *Lefty1* in der anterioren Mittellinie verantwortlich sind³⁴⁴. Um eine präzise Aussage zum Wnt/ β -Catenin-Signalweg auf die Entwicklung der Links/Rechtsachse in Bezug auf die Windung des linearen Herzrohres treffen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen spezifischer Gene der Links/Rechtsachse an zahlreichen Embryonen. Handelt es sich um einen frühzeitigen Verlust der *Lefty1*-Expression in der anterioren Mittellinie müsste in einigen Embryonen die bilaterale Expression von Nodal- und Lefty2-Liganden im anterioren Plattenmesoderm zu finden sein, wie es in *Lefty1*^{-/-}, *Wnt3a*^{-/-} und *Smad1*^{+/-}*Smad5*^{+/-}-Mutanten detektiert wurde^{195;232;317}.

Zusammenfassend können die gewonnenen Ergebnisse frühere widersprüchlichen Daten aus Drosophila-, Frosch-, Huhn- und Mausembryonen sowie aus ES-Zellen aufklären und zeigen in der Maus erstmalig die essentielle Funktion des Wnt-Signalweges in der Aufrechterhaltung zweiter Herzfeldvorläuferzellen. Inaktivierende und aktivierende β -Catenin-Mutationen in mesodermalen Herzvorläuferzellen weisen darauf hin, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg während der frühen Herzentwicklung präzise reguliert werden muss, damit sich ein windendes Herzrohr entwickeln kann. So sind bei Verlust von β -Catenin in mesodermalen Herzvorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes ausschließlich Defekte in zweiten Herzfeldderivaten und der Aufrechterhaltung *Isl1*-exprimierender zweiter Herzfeldvorläuferzellen zu beobachten, während sich das erste Herzfeld normal entwickelt. Auf der anderen Seite führt die konstitutive Aktivierung von β -Catenin in beiden Herzvorläuferzellen zum Verlust der Herzrohrbildung und des linken Ventrikels möglicherweise durch Aufrechterhaltung des Vorläuferstatus beider Herzfeldzellen und gesteigertem Zelltod zweiter Herzfeldzellen.

Die verschiedenen Phasen des kanonischen Wnt-Signalweges während der embryonalen Herzentwicklung

Frühere Studien in Frosch- und Huhnembryonen zeigten, dass der Wnt-Signalweg für die frühe Herzspezifizierung gehemmt werden muss, während Arbeiten in

Drosophilaembryonen oder ES-Zellkulturen den entgegengesetzten Effekt zeigten und mindestens sechs kanonische Wnt-Liganden in früh-embryonalen Herzstrukturen exprimiert werden. Das konträre Wissen um den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Herzentwicklung war Auslöser für unterschiedliche Studien in ES-Zellen sowie Fisch- und Mausembryonen, in welchen verschiedene Stadien der frühen Herzentwicklung untersucht wurden und welche gemeinsam mit unserer Veröffentlichung im letzten Jahr erschienen sind. Alle Studien deuten auf eine präzise temporale und regionale Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, so dass sich heute mindestens fünf verschiedene Phasen der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung während der embryonalen Herzentwicklung ergeben (Abb.16). Frühere konträre Ergebnisse in Drosophila-, Frosch-, und Huhnembryonen sowie ES-Zellen könnten auf verschiedene Punkte zurückzuführen sein: I) auf den Ursprung der untersuchten Zellen (regional), da damals z.B. noch nicht zwischen ersten und zweiten Herzvorläuferzellen unterschieden wurde. II) auf die verschiedenen Phasen der Wnt/ β -Catenin-Signalgebung (temporal). III) auf Spezies-spezifische Unterschiede in der Entwicklung mesodermaler Herzstrukturen. IV) auf Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen und Einfluss von In Vivo-angrenzenden Zellen, welche in Ex Vivo- oder ES-Zellstudien nicht vollständig nachgebildet werden können.

Phase 1. In der frühesten Phase wird die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im posterioren Epiblast (Abb.16, hellblau) benötigt, um während der Gastrulation die Bildung des mesodermalen Keimblattes zu induzieren, aus welchem unter anderem mesodermale Herzvorläufer hervorgehen. So führt der konventionelle Verlust von β -Catenin, Wnt-3, Mesd oder der kombinierte Verlust von Lrp5/6 in der Maus zum Verlust des mesodermalen Keimblattes^{79;82-84}. In Maus-ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass hohe Bmp- und Wnt-Signalaktivität benötigt wird, um die Expression von MesP1 zu aktivieren^{345;346}, d.h. die Aktivierung des Wnt-Signalweges ist nicht nur essentiell für die Bildung von Mesoderm sondern auch für die Vorspezifizierung des Mesoderms in Herzmesoderm.

Phase 2. In der zweiten Phase muss der Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibiert werden, damit die Spezifizierung von Herzmesoderm in zwei Herzvorläuferpopulationen und die anschließende Differenzierung in Kardiomyozyten des ersten Herzfeldes stattfinden kann. So konnten in Maus-ES-Zellen mittels konditioniertem Wnt-3a-Medium erst mesoderm-

spezifische Gene sowie früh-herzspezifische Gene angeschaltet und nach wenigen Tagen schlagende Kardiomyozyten detektiert werden, während durch Inhibition, z.B. mittels *Dkk1*, keine Spezifizierung in Herzmesoderm stattfinden kann^{300;345-349}. Die Differenzierung von Maus-ES-Zellen in schlagende Kardiomyozyten wurde auf die verstärkte *Sox17*-Expression zurückgeführt³⁴⁵. *Sox17* wird in Anwesenheit aktiver Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalgebung erhöht, kann seinerseits mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren um die Bindung an β -Catenin kompetieren und dessen transkriptionelle Aktivität unterbinden³⁴⁵. Hingegen wurde in Froschembryonen die durch Wnt-Inhibitoren-induzierte Herzspezifizierung in *Nkx2-5*- und *Tbx5*-exprimierende Zellen auf die Aktivierung der *Hex*-Expression zurückgeführt³⁵⁰. Des Weiteren konnte in Fischebryonen gezeigt werden, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in mesodermalen Zellen benötigt wird, um die Spezifizierung in Herzmesoderm zu induzieren, während der Wnt-Signalweg kurze Zeit später durch die verstärkte *Dkk1*-Expression gehemmt werden muß, um die Größe, Entwicklung und Differenzierung von Herzzellen zu kontrollieren^{346;351}. Außerdem zeigen die in dieser Studie vorgestellten Mausdaten, dass die konstitutive Aktivierung von β -Catenin in Herzvorläuferzellen zum Verlust der Bildung eines linearen Herzrohres führt, möglicherweise durch die Aufrechterhaltung des Vorläuferstatus in ersten Herzfeldzellen und damit Verlust der Differenzierung in Kardiomyozyten im zentralen anterioren Bereich.

Phase 3. In der dritten Phase muss die Wnt/ β -Catenin-Signalgebung speziell in zweiten Herzfeldvorläuferzellen aktiviert werden, um die *Isl1*-exprimierenden Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes aufrecht zu erhalten. So führen inaktivierende β -Catenin-Mutationen in Vorläuferzellen des zweiten bzw. cranialen Herzfeldes (*Isl1-cre*, *AHF-Mef2c-cre*), in differenzierenden Kardiomyozyten des ersten und zweiten Herzfeldes (*Nkx2-5-cre*) oder in glatten Muskelzellen im distalen Ausflusstrakt (*SM22 α -cre*) zur verminderten Proliferation von *Isl1*-exprimierenden zweiten Herzfeldzellen und damit zur Verkürzung zweiter Herzfeldderivate (Ausflusstrakt und rechter Ventrikel). Im Gegensatz dazu resultiert die konstitutive Aktivierung von β -Catenin mittels dieser verschiedenen cre-Rekombinasen in der Überproliferation und damit Verbreiterung des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels^{348;349;352-354}. In der hier vorgestellten Studie wurde der Effekt aktivierender und inaktivierender β -Catenin-Mutationen in mesodermalen Herzvorläuferzellen untersucht (*MesP1-cre*), welche in früheren und stärkeren Phänotypen resultierten. Im Gegensatz zu

den anderen Studien, wurden hier β -Catenin-Mutationen bereits vor der Vorspezifizierung der Herzmesodermzellen in Zellen des ersten und zweiten Herzfeldes eingeführt. Der abweichende Phänotyp von aktivierenden β -Catenin-Mutanten könnte deshalb möglicherweise auf die Aufrechterhaltung des Vorläuferstatus erster Herzvorläuferzellen zurückgeführt werden, während in den anderen Studien β -Catenin-Mutationen erst nach beginnender Differenzierung des ersten Herzfeldes eingeführt werden konnten.

Phase 4. Durch die Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wird in der Phase 4 die Differenzierung proximaler zweiter Herzfeldzellen in Kardiomyozyten eingeleitet. In Ex Vivo-Studien mit multipotenten Isl1-exprimierenden Herzvorläuferzellen bewirkte konditioniertes Wnt-3a-Medium die Expansion Isl1-exprimierender Zellen, während weniger oder keine Differenzierung in Kardiomyozyten beobachtet wurde³⁴⁹. Außerdem wurde in aktivierenden und inaktivierenden β -Catenin-Mutanten (AHF-Mef2c-cre) im Ausflusstrakt entweder der Verlust an SMA-exprimierenden glatten Muskelzellen oder der erhöhter Gehalt an *MLC2a*-exprimierenden Kardiomyozyten beobachtet^{349;352}.

Phase 5. In der Phase 5 wird die Proliferation von Neuralleistenzellen und distalen Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes durch aktive Wnt/ β -Catenin-Signalgebung kontrolliert. In konditionellen Mausmutanten, in welchen β -Catenin in Neuralleistenzellen oder Endothelzellen (Wnt1-cre, Tie2-cre) eliminiert wird, wurden Wnt-spezifische Defekte bei der epithelial-mesenchymalen Veränderung der Zellstruktur im Atrioventrikularbereich sowie Defekte bei der korrekten Teilung der Ausflusstraktgefäße beobachtet^{271;306}. Diese Defekte wurden auf die verminderte Proliferation von Neuralleistenzellen durch Verlust von *Pitx2* und *CycD2*²⁷¹ bzw. auf frühzeitige Differenzierung endothelialer Zellen in mesenchymale glatte Muskelzellen nach Behandlung mit Tgf- β ³⁰⁶ zurückgeführt. *Pitx2* kontrolliert nicht nur die Proliferation von Neuralleistenzellen und distalen zweiten Herzfeldzellen durch die direkte Aktivierung der *CycD2*-Expression, sondern auch die Expression von nichtkanonischem *Wnt-11*^{354;355}. Wnt-11 ist entscheidend für die gerichtete Zellmigration im Ausflusstrakt sowie für die epithelial-mesenchymale Veränderung des Zytoskeletts im Atrioventrikularbereich durch Aktivierung der Tgf- β 2-Expression³⁵⁵.

Zusammenfassend zeigt die Inaktivierung und Aktivierung des β -Catenin-Genes in verschiedenen herzspezifischen Zelllinien und zu unterschiedlichen Stadien der

embryonalen Herzentwicklung, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg zeitlich unterschiedliche Funktionen während der Bildung, Aufrechterhaltung und Differenzierung von Herzvorläuferzellen hat^{356;357}. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg scheint essentiell für die Aufrechterhaltung des Vorläuferzellstatus zu sein und muss inhibiert werden, damit die Differenzierung in Kardiomyozyten induziert werden kann.

Wechselwirkung der Wnt/ β -Catenin- und BmpRia-Signalwege mit dem transkriptionellen Netzwerk während der frühen Herzentwicklung

Es entsteht die Frage wie die Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege mit dem bisher etablierten transkriptionellen Netzwerk wechselwirken können, welches essentiell für die korrekte Herzentwicklung ist (Abb.4, Abb.17). Während frühere Studien bereits zeigten, dass die Aktivierung des Bmp-Signalweges in allen untersuchten Spezies, exklusive Maus, entscheidend ist für die Bildung und Spezifizierung des Herzens, wurde die Funktion des Wnt/ β -Catenin-Signalweges lange Zeit kontrovers diskutiert^{271;279-281;299;300;307}. Die hier ermittelten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der BmpRia-Signalweg die Aufrechterhaltung von *Nkx2-5*, sowie direkt oder indirekt die Expression von *Gata6*, *Tbx5* und damit auch *eHand* kontrolliert (Abb.17). Frühere Studien zeigten bereits Bmp-spezifische Smad1/5/8-Bindestellen auf Promotoren von *Nkx2-5*- sowie *Gata*-Genen und dass *Nkx2-5* entscheidend ist für die Expression von *eHand* im linken Ventrikel^{205;249-252;341}. In Huhnembryonen konnte gezeigt werden, dass *Bmp2*, welches medial zur Herzregion detektierbar ist, die Expression von *Nkx2-5* und *Gata4/5/6* induziert, während die Hemmung des Bmp-Signalweges durch implantierte *Noggin*-exprimierende Zellen die *Nkx2-5*- und *eHand*-Expression inhibiert³⁴⁰. Die hier erstmalig gezeigte essentielle Funktion der Bmp-Signalgebung, vorrangig in der Spezifizierung erster Herzfeldzellen in der Bildung früh-embryonaler Herzstrukturen der Maus, stimmt somit mit früheren Ergebnissen in Huhnembryonen überein^{277;337;340}.

Andererseits zeigte die konditionelle Mutagenese des β -Catenin-Genes in der Maus in dieser Arbeit und fünf weiteren Studien die essentielle Funktion des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in der Aufrechterhaltung *Isl1*-exprimierender zweiter Herzfeldvorläuferzellen^{348;349;352-354}. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass sich im Promotor des *Isl1*-Genes zwei konservierte LEF/TCF-Bindestellen befinden. Außerdem

konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation in Herzextrakten (E9.5) die Präsenz von β -Catenin auf diesen Promotorstellen nachgewiesen werden³⁵⁴. Unsere Untersuchungen auf RNA und Proteinebene, sowie die spezifische Auszählung *Isl1*-exprimierender Zellen zu verschiedenen Entwicklungsstadien ergaben hingegen vergleichbare *Isl1*-Zellzahlen im Herzrohrstadium und proportional zur Proliferationsverlust abnehmende *Isl1*-Zellzahlen im Herzwindungsstadium von inaktivierenden β -Catenin-Mutanten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg nicht für die initiale *Isl1*-Expression verantwortlich ist, jedoch möglicherweise in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren die Aufrechterhaltung der *Isl1*-Expression zu späteren Zeitpunkten kontrolliert. Neben Defekten in der Proliferation *Isl1*-exprimierender Zellen konnten Veränderungen in der Expression von *Bmp4* sowie *CycD2* beobachtet werden^{348;352}. Bereits in früheren Studien wurde in der Maus die Wnt/ β -Catenin-abhängige transkriptionelle Kontrolle von *Bmp4* und *CycD1/2* nachgewiesen^{92;105;271;319;336;358}. Zum einen könnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Proliferation *Isl1*-exprimierender zweiter Herzfeldzellen über die Aktivierung der Bmp-Signalgebung mittels *Bmp4* kontrollieren oder direkt über die transkriptionelle Kontrolle von *CycD2*. Studien in Drosophilaembryonen zeigten bereits, dass Wg (Wnt-1-Homolog) und Decapentaplegic (*Bmp2/4*-Homolog) in der Bildung des dorsalen Herzschauches kooperieren^{274;299;359}, und dass der kanonische Wnt-Signalweg in ES-Zellen die Expression von *Bmp2/4* aufrechterhält sowie herzspezifische Gene aktivieren kann³⁰⁰. In Huhnembryonen konnte außerdem gezeigt werden, dass *Bmp4* die Expression von *Isl1* in zweiten Herzfeldvorläuferzellen erhöht und entscheidend ist für die Migration zweiter Herzfeldzellen in den wachsenden Ausflusstrakt^{214;337}. Der Verlust von *Bmp4* im splanchnischen Mesoderm sowie Ausflusstrakt könnte demnach die Erklärung für die hier ermittelten Herzdefekte in inaktivierenden β -Catenin-Mutanten sein.

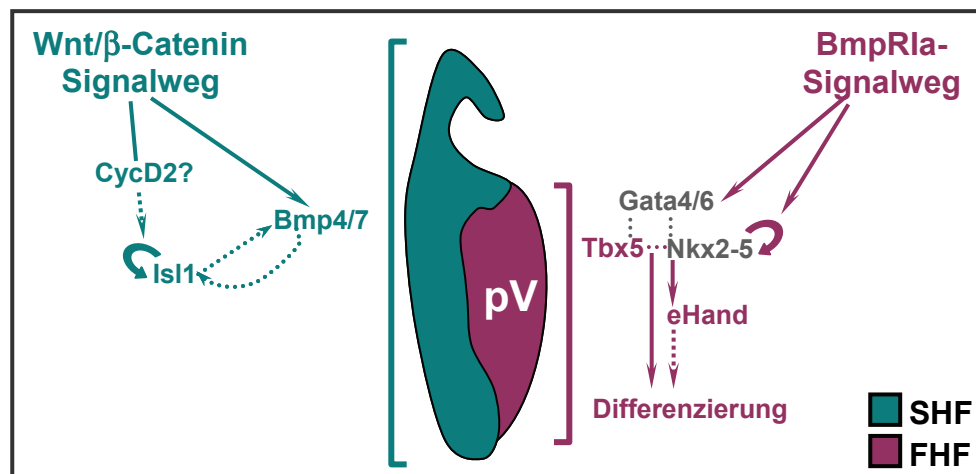


Abb. 17: Wechselwirkungen der BmpRla- und Wnt/β-Catenin-Signalwege mit dem bekannten transkriptionellen Netzwerk. Die schematische Darstellung des linearen Herzrohres (E8.35, Seitenansicht) zeigt die Position erster (rot) und zweiter (grün) Herzfeldzellen, wo die Bmp- und Wnt-Signalwege auf die herzspezifische Genexpression einwirken könnten und in welchem Herzfeld die Gene zu diesem Zeitpunkt exprimiert werden. Proteininteraktionen sind mittels gepunkteter Linien zwischen den Molekülen dargestellt. Direkte positive (Pfeile) oder negative Regulation (Balken) wurden mit durchgezogenen Linien markiert, während einige Regulationen indirekt beschrieben oder noch nicht entschlüsselt wurden (gestrichelte Pfeile). FHF; first heart field; pV, primitiver Ventrikel; SHF, second heart field.

Der konditionelle Verlust von β-Catenin in mesodermalen Herzvorläufern des ersten und zweiten Herzfeldes (MesP1-cre aktiv ab E6.5), differenzierenden Kardiomyozyten beider Herzfelder (Nkx2-5-cre aktiv ab E7.5) oder spezifisch in zweiten Herzfeldvorläufern (Isl1-cre, aktiv ab E7.5) führen zu verminderter *Bmp4*- sowie *CycD2*-Expression und defekter Proliferation Isl1-exprimierender Zellen, während die Expression von *Fgf8/10* nicht gestört wurde^{348;354}. Im Gegensatz dazu resultierte die konditionelle Mutagenese des β-Catenin-Genes in Zellen des distalen Ausflusstraktes (SM22a-cre, AHF-Mef2c-cre) in Veränderungen der *Fgf10*-Expression sowie daraus folgend in der Phosphorylierung von Erk1/2^{352;353}. In der Arbeit von Cohen et al. (2007) wurde gezeigt, dass sich im Promotor des *Fgf10*-Genes zwei konservierte LEF/TCF-Bindestellen befinden. Außerdem konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation in Herzextrakten des Ausflusstraktes (E9.5) die Präsenz von β-Catenin auf diesen Promotorstellen nachgewiesen werden³⁵³. Neben *Fgf10* sind auch die Expressionen von *Fgf3/16/20* in SM22α-spezifischen β-Catenin-Mutanten verändert und die kombinierte Behandlung von distalen Ausflusstraktexplanten mit Wnt-3a sowie *Fgf10* führte zur synergistischen Erhöhung der *Isl1*-Expression, während Inhibitoren von Fgf-Rezeptoren den positiven Effekt von Wnt-3a auf die *Isl1*-Expression zerstören³⁵³. β-Catenin scheint damit nicht nur die Expression von *Bmp*-Liganden sondern auch von

Fgf-Liganden im zweiten Herzfeld zu kontrollieren und wirft die Fragestellung auf, wie diese Signalwege miteinander kooperieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die *Fgf*/MAPK- und Wnt/ β -Catenin-Signalgebung die Dauer der Bmp-Signalgebung beeinflussen können¹⁵². Normalerweise führt die Bindung von Bmp-Liganden zur Rezeptor-aktivierten C-terminalen Phosphorylierung von Smad1/5/8, kann jedoch auch die Aktivierung von MAPK (z.B. p38, NLK) induzieren^{150-153;360-362}. C-terminal phosphoryliertes Smad1/5/8 komplexiert mit Smad4 und kann in den Zellkern translozieren, um dort Bmp-spezifische Zielgene zu aktivieren. Nukleäre Phosphatasen, welche C-terminale Phosphatgruppen abspalten können, inaktivieren Smad1/5/8 und führen zu dessen Transport aus dem Zellkern^{153;363}. Interessanterweise können Bmp- oder *Fgf*-aktivierte-MAPK Smad1 zwischen den zwei MAD-Homologen-Domänen phosphorylieren und eine zweite Phosphorylierung über Gsk-3 β einleiten, welche Bmp-spezifisches Smad1 für den proteasomalen Abbau mittels Smurf vorbereitet¹⁵². Die gleichzeitige Aktivierung von Bmp- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegen kann durch Inaktivierung von Gsk-3 β den Abbau von Smad1 stoppen und die Dauer der Aktivierung Bmp-spezifischer Zielgene verlängern. Andererseits würde die gleichzeitige Aktivierung von Bmp- und *Fgf*-Signalwegen zur Phosphorylierung von Smad1 zwischen den MAD-Homologen-Domänen führen und so die Aktivierung Bmp-spezifischer Zielgene unterbunden werden. Möglicherweise sorgt in zweiten Herzfeldvorläuferzellen ein entgegengesetzter Gradient von Wnt/ β -Catenin-regulierten *Fgf*- und Bmp-Liganden für die korrekte Länge von zweiten Herzfeldderivaten. So könnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg im distalen Ausflusstrakt, angrenzend an Kopfmesoderm und einwandernde Neuralleistenzellen, die *Fgf*-Expression und die Proliferation *Isl1*-exprimierender zweiter Herzfeldzellen induzieren und gleichzeitig die Dauer der Bmp-Signalgebung über pSmad1 verkürzen. Im mittleren Teil des Ausflusstraktes könnte die Wnt/ β -Catenin-Signalgebung die Expression von Bmp und Proliferation *Isl1*-exprimierender Zellen antreiben und gleichzeitig die Dauer der Aktivierung Bmp-spezifischer Zielgene verlängern. Im proximalen Ausflusstrakt, angrenzend am primitiven Ventrikel, scheinen Bmp-Liganden für die Differenzierung in Kardiomyozyten des rechten Ventrikels verantwortlich zu sein. Ein Hinweis darauf, dass alle drei Signalwege regional und temporal in der Aufrechterhaltung *Isl1*-exprimierender Zellen im zweiten Herzfeld kooperieren, sind ähnliche Defekte in zweiten Herzfeldderivaten nach Verlust nur eines Signalweges, d.h.

durch verringerte Proliferation ausgelöste Verkürzung des Ausflusstraktes und rechten Ventrikels^{195;348;349;352-354;364}.

Die Modulation beider Signalwege, Wnt/ β -Catenin und Bmp, wurde bereits in Huhnembryonen als essentiell für die Herzentwicklung beschrieben, aber wie sie miteinander vernetzt sind, blieb bisher ungeklärt²⁷⁹. Die Ergebnisse unserer Studie ergeben erstmalig eine Kooperation zwischen Wnt/ β -Catenin- und Bmp-Signalwegen in der Aufrechterhaltung zweiter Herzfeldzellen. Wie diese Signalwege jedoch das herzspezifische transkriptionelle Netzwerk beeinflussen, ob sie parallel aktiviert werden oder tatsächlich in Reihe geschaltet sind, erfordert weitere Studien, z.B. mittels kombinierter Mutagenese in der Maus. Vorläuferzellen des zweiten Herzfeldes sind multipotent, d.h. sie haben das Potential in alle kardiovaskulären Zellwege (Myokard, Endokard und glatte Muskulatur) zu differenzieren, und der Vorläuferstatus wird durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufrechterhalten³⁶⁵. In Fisch-Herzregenerationsstudien wurde die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges beobachtet und unterstreicht die Wichtigkeit dieses Signalweges in der Stamm- bzw. Vorläuferzellbiologie und Regeneration^{357;366}. So könnte das Wissen um die Aufrechterhaltung der Multipotenz von Herzvorläuferzellen durch den kanonischen Wnt-Signalweg, z.B. in Menschen mit ischämischem Infarkt, für therapeutische Zwecke eingesetzt werden^{349;351}. Jedoch nicht ausschließlich in der Regeneration des humanen Herzens könnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg von entscheidender Bedeutung sein, sondern auch während der embryonalen Herzentwicklung in der Entstehung von angeborenen Herzdefekten. So ist z.B. der Einfluss beider Signalwege auf die Kooperation zwischen Neuralleistenzellen und zweiten Herzfeldzellen in der Bildung von epithelial-mesenchymalen Veränderungen des Zytoskeletts während der Herzklappenbildung und die Teilung der Ausflusstraktgefäße von besonderem Interesse. Hier führt der Verlust der β -Catenin- oder der Bmp-Signalgebung zu ähnlichen Defekten, wie z.B. doppeltem Ausflusstraktgefäßausgang am rechten Ventrikel, Transposition der großen Gefäße oder fortbestehendem Arterienhauptstamm (persistent truncus arteriosus) [s.Tab.1 (S.25)]. Dabei handelt es sich um Herzdefekte in der Maus, welche auch im Menschen als angeborene Herzdefekte in 1 von 1.000 Lebendgeburten auftreten können³⁶⁵. Menschen überleben diese angeborenen Herzdefekte mittels korrigierenden Operationen zumeist, erkranken danach jedoch oft an sekundären Herzdefekten. Deshalb ist es nicht nur entscheidend embryonale Defekte zu

verstehen sondern auch mögliche postnatale Konsequenzen angeborener Herzdefekte zu berücksichtigen³⁶⁵.

Materialien und Methoden

Materialien und molekularbiologische Standardmethoden

Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Enzyme, Marker, full length cDNA-Klone und Oligonukleotide wurden von den Herstellern Amersham-Buchler (Braunschweig), Böhlinger Mannheim (Mannheim), BioTez (Berlin), Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs (Schwalbach/ Taunus), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Basel/ Mannheim), Stratagene, Transduction Laboratories (USA) und ImaGenes („RZPD“, Berlin) verwendet. Für die verschiedenen, nachfolgend erläuterten Methoden wurden gebräuchliche Laborchemikalien, soweit nicht anders angegeben, von nachfolgenden Herstellern verwendet: Fluka (Neu-Ulm), Heraeus-Kulzer (Wehrheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Verwendete Geräte

Die Durchführung der Versuche bedurfte dem Gebrauch von: PCR-Gerät (Biometra, T3 Thermocycler), Zentrifugen (Centrifuge 5402, Eppendorf; Centrifuge J2-21, Beckman), Mikroskope [StemiSV11 (Apo), Zeiss; Axioskop, Zeiss; LSM 5 Pascal, Zeiss] und Mikrotome (Microm HM400R, Microm HM360, Microm HM560).

Bakterienstamm

Es wurden ausschließlich konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstämme von E.coli verwendet (XL-1 blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]).

Antikörper und cDNAs

Es wurden folgende Antikörper verwendet: Goat-anti-β-Galactosidase (Biogenesis; 1:2000), Rabbit-anti-Phospho-Smad1/5/8 (Cell Signaling Technology; 1:150), Guinea Pig-

anti-Isl1/2 (zur Verfügung gestellt von T.Jessel/New York; 1:20 000) and Rabbit-anti-Phospho-Histone H3 (Upstate; 1:250), Rabbit-anti- β -Catenin (³⁴; 1:1000), Mouse-anti- β -Catenin (BD Transduction Laboratories; 1:500), Anti-DIG Fab an alkalische Phosphatase gekoppelt (Roche; 1:4000), Cy2- oder Cy3-gekoppelte sekundäre Antikörper (Jackson Immuno Research; 1:400). Kernfärbung wurde mittels DAPI (Sigma; 1:2000) oder TOTO (TOTO-3-iodide, Invitrogen; 1:2000) durchgeführt.

Für In-Situ-Hybridisierungen wurden Anti-sense RNA-Transkripte der folgenden Maus-cDNAs verwendet: Axin2 (BC057338); Bmp2 (NM_007553.2); Bmp4 (X56848.1); Bmp7 (NM_007557.2); BmpR1a (NM_009758); Fgf8, dHand, eHand, Lefty1/2, Pitx2c und Tbx5 (zur Verfügung gestellt von Prof. M.Blum/Stuttgart-Hohenheim); Fgf10 (NM_008002.3); Gata4 (NM_008092); Gata6 (NM_010258); Isl1 (NM_021459.2); Mef2c (BC026841.1); MLC2a; Nkx2-5 (AF091351.1); Nodal (X70514.1) und Wnt11 (NM_009519.1).

Standardmethoden und Kits

Molekularbiologische Standardmethoden basieren auf den Laborhandbüchern von Sambrook et al. (1989)³⁶⁷, Ausubel et al. (1987)³⁶⁸ und Berger et al. (1987)³⁶⁹ und wurden im Folgenden nicht näher beschriebenen. Zu diesen Methoden gehören unter anderem: Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Phenolchloroform-extraktion zur Aufreinigung linearisierter Plasmid-DNA, Transformation von Bakterien sowie Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen u.v.m. Unter Verwendung von Kits und deren Herstellerangaben wurden folgende Methoden durchgeführt: Plasmid-DNA-Präparation im quantitativen Maßstab (Qiagen), Digoxigenin-Markierung von RNA-Sonden (Roche) und deren Aufreinigung mittels RNeasy Kit (Qiagen).

Verwendete Mauslinien und deren Genotypisierung

Es wurden die folgenden Mauslinien verwendet: β -Catenin^{lox} (¹⁰⁹), β -Catenin^{loxEx3} (³²⁶), BmpR1a^{lox} (³²⁵), MesP1-cre (²⁰⁸), Axin2^{lacZ} (³²⁰) und der Z/AP-Indikator-Stamm (³³⁰). Für die Genotypisierung der Tiere wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. (1988)³⁷⁰ angewendet. Dafür wurden zunächst Ohrbiopsien adulter Mäuse in 35µl Lysepuffer [100mM Tris pH8.5, 10mM EDTA pH8, 0.2%SDS, 200mM NaCl, 0.2µg/µl Proteinase K (Sigma)] bzw. Amnion oder Dottersack von Mausembryonen in

10µl Lysepuffer (8.8µl H₂O, 1µl 10xTaq-Polymerase-Puffer, 0.2µg/µl Proteinase K) über Nacht bei 55°C lysiert. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden Ohr- und Dottersacklysate (1:20 bzw. 1:5) verdünnt, die in den Mauspublikationen beschriebenen PCR- Konditionen und Programme eingesetzt und folgende PCR-Primer verwendet:

β-Catenin ^{lox}	βCat662: 5'- ACT GCC TTT GTT CTC TTC CCT TCT G- 3'
	βCat803n: 5'- CAG CCA AGG AGA GCA GGT GAG G- 3'
β-Catenin ^{loxEx3}	βCat482: 5'- AGA ATC ACG GTG ACC TGG GTT AAA- 3'
	βCat1051n: 5'- CAT TCA TAA AGG ACT TGG GAG GTG T- 3'
BmpRIa ^{lox}	Alk3-fwd: 5'- GGA GAC AGG TTT GGA TCT TAA CCT TAG G- 3'
	Alk3-rev: 5'- GCC TCA CTC CTC ACC GTG CTC- 3'
MesP1-cre	MesP1cre: 5'- GAA AGA ACC AGC TGG GGC TCG AG- 3'
	MesP1-GR1: 5'- ATA TGC CAA GTC ATT GAG GTG AGC TTT C- 3'
Cre	Cre439: 5'- GAA CGC ACT GAT TTC GAC CA- 3'
	Cre639: 5'- AAC CAG CGT TTT CGT TCT GC- 3'
Axin2 ^{lacZ}	Ckoln4: 5'- AAG CTG CGT CGG ATA CTT GAG A- 3'
	NLS-BJ1: 5'- TGG TAA TGC TGC AGT GGC TTG- 3'
	Ex2-AS3: 5'- AGT CCA TCT TCA TTC CGC CTA GC- 3'
Z/AP	LacZ-144: 5'- TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT- 3'
	LacZ-608n: 5'- ATA TCC TGA TCT TCC AGA TAA CTG CCG- 3'

Immunhistochemie

Mausembryonen wurden in eiskaltem PBS präpariert, das Alter mittels Zählung der Somitenpaare bestimmt, und die Embryonen wurden über Nacht bei 4°C schüttelnd in 4%Formaldehyd fixiert. Abhängig von der Weiterverwendung wurden Embryonen zum einen in aufsteigender Methanolreihe (je 10-20Minuten: 25%, 50%, 75%, 100%Methanol) dehydriert und in 100% Methanol bei -20°C bis zur Weiterverwendung in In-Situ-Hybridisierungen eingelagert. Zum anderen wurden Embryonen für β-Galaktosefärbungen am ganzen Embryo, für Schnitte (Objektträger: SuperFrost Plus, Menzel-Glaeser) und anschließende histologische oder Antikörperfärbungen vorbereitet (s. folgende Kapitel).

Histologische Färbungen von Embryonenschnitten

Histologische Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin/Eosin) wurden auf Paraffin- oder Plastikschnitten durchgeführt. Für Paraffinschnitte wurden die Embryonen nach über Nacht-Fixierung in 4% Formaldehyd in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 10-20Minuten: 70%, 80%, 95%, 2x 100%Ethanol) dehydriert, 2x 45min in Toluol inkubiert, danach über Nacht in flüssiges, 60°C-warmes Paraffin überführt und im Folgenden in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Microm HM400R) wurden 8µm- dünne Paraffinschnitte angefertigt und in ein 55°C-Wasserbad überführt, von welchem die Schnitte auf Objektträger aufgezogen wurden. Die getrockneten Paraffinschnitte wurden über Nacht im 60°C-Ofen erwärmt und die Objekte danach in drei siebenminütigen Xylolschritten vom Paraffin befreit. Nach Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (je 3min: 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol) wurden die Schnitte erst 1min in Hämatoxylin gefärbt, sofort in rinnendes warmes Leitungswasser überführt (10min) und danach 5min in 0.1%-ethanolischem Eosin gefärbt, wieder in ansteigender Ethanolreihe dehydriert und in zwei 3-minütigen Xylolschritten auf die anschließende Eindeckelung mit Entellan (Merck) vorbereitet.

Für Plastikschnitte wurden Embryonen (nach Präparation und über Nacht-Fixierung oder In-Situ-Hybridisierung und 7-minütiger 2.5%Glutaraldehyd/PBS-Fixierung) in einer aufsteigenden Methanolreihe (je 30Minuten: 25%, 50%, 75%, 100% Methanol) dehydriert und danach in 100% Ethanol überführt. Die Embryonen wurden in Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer, Wehrheim)/100% Ethanol (1:1) für 1h bei RT vorinkubiert und für eine weitere Stunde in reinem Technovit7100 (mit Härter1) inkubiert, bevor sie in kalt-polymerisierende Plastik (Technovit7100/Härter1 und Härter2 im Verhältnis 1:15) eingebettet wurden. Zur korrekten Ausrichtung der Embryonen wurde während der 30-minütigen langsamen Polymerisationszeit mit Hilfe von Injektionskanülen (Braun, Melsungen) und unter dem Mikroskop gearbeitet. Nach Über-Nacht-Endpolymerisierung wurde eine Halterung auf den Block gegossen (Technovit 3040) und die fertigen Blöcke bis zur Weiterverwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. 6µm-Plastikschnitte wurden am Microm HM360 (Walldorf) geschnitten, zur Glättung in ein 55°C-warmes Wasserbad überführt und auf Objektträgern gesammelt. Plastikschnitte bereits In-Situ-hybridisierter Embryonen konnten direkt nach Trocknung unter dem Mikroskop fotografiert werden (Axioskop, Zeiss). Für Hämatoxylin/Eosin-Färbungen wurden Plastikschnitten 15-20min in Hämatoxylin gefärbt, sofort in rinnendes handwarmes Leitungswasser (15min) und

danach in rinnendes VE-Wasser (2min) überführt, bevor die 8-minütige Färbung in Eosin (0.25% Eosin Y, 0.1M Essigsäure) und Waschung mit 2x 5min VE-Wasser folgte. Nach Trocknung wurden die gefärbten Plastikschnitte mit Entellan eingedeckelt.

Immunfluoreszenz- und TUNEL- Färbung auf gefrorenen Embryonenschnitten

Für Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Embryonen in PBS präpariert, in 4% Formaldehyd (3-4h) bei 4°C fixiert, danach in kaltem PBS gewaschen (5x4min) und in 5% Saccharose (in 0.1M NaH₂PO₄*2H₂O) für 3h bei 4°C vorinkubiert bevor sie über Nacht bei 4°C in 20% Saccharose (in 0.1M NaH₂PO₄*2H₂O) überführt wurden. Am nächsten Tag wurden die Embryonen in Tissue Tek (Sakura, Nederland) auf einem in Ethanol-Trockeneis gekühlten Metallblock eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. 14µm-Kryostatschnitte wurden am Kryostat (Microm HM560, Walldorf) durchgeführt, auf Objektträger gezogen und bis zur Weiterverwendung bei -70°C aufbewahrt. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Objektträger 5min in PBS gewaschen, anschließend für 30min in 10% Goatserum in TNB (100mM Tris pH7.5, 150mM NaCl) blockiert und danach über Nacht mit den primären Antikörpern (in 10% Goatserum/TNB) bei 4°C inkubiert. Nach der Primär-Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte zweimal für 8min in PBST (PBS+0.1%Tween) gewaschen, für 10min blockiert (in 10%Goatserum/TNB) und abgedunkelt für 2h mit den fluoreszierenden Sekundärantikörpern (sowie mit DAPI bzw. TOTO in 10% Goatserum/TNB) bei RT inkubiert. Nach der Sekundär-Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte abgedunkelt zweimal 8min in PBST gewaschen und anschließend mit Immumount (Thermo Shandon) eingedeckelt sowie kühl und dunkel eingelagert. Fotos konnten nach Trocknung der Schnitte am konfokalen Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss) angefertigt werden.

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotide transferase nick-end labeling) durchgeführt. Mittels dieser Methode werden die stumpfen Enden von DNA-Doppelstrangbrüchen mit Fluorescein markiert. Für die gekoppelte Fluoresceinmarkierung apoptotischer Zellen sowie gleichzeitige Fluoreszenzfärbung anderer Proteine wurde mit der zuvor beschriebenen Immunfluoreszenzfärbung begonnen. Nach der Sekundär-Antikörper-Inkubation und den zwei PBST- Waschschritten wurde die Schnitte nach Beschreibung des Herstellers für 'Apop Taq PLUS, in situ Apoptosis Detection Kit, Fluorescein' (Chemicon, Temecula)

abgedunkelt weiterbehandelt. Nach mikroskopischen Aufnahmen wurde der Anteil apoptotischer bzw. mitotischer (pHH3) Zellen durch Auszählung bestimmt und statistisch ausgewertet. Dafür wurden die verschiedenen Gruppen mittels one-way ANOVA gefolgt vom Bonferroni Test verglichen.

In-Situ-Hybridisierung am ganzen Embryo

Für In-Situ-Hybridisierungen am ganzen Embryo wurden genotypisierte Embryonen (eingelagert in 100% Methanol bei -20°C) nach Alter, Genotyp und zu hybridisierender DIG markierter RNA-Sonde in eine mit 1% BSA in DEPC-H₂O und DEPC-H₂O vorgespülte 24-Lochplatte einsortiert. Alle im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit DEPC- H₂O angesetzt und vor jedem Versuch steril filtriert. Das Protokoll für In-Situ-Hybridisierungen am ganzen Embryo bedarf einer viertägigen Behandlung der Embryonen und wurde wie folgt durchgeführt:

Der erste Behandlungstag wurde soweit nicht anders beschrieben auf Eis durchgeführt. Am ersten Tag der Behandlung wurden die Embryonen 15min in 6%H₂O₂ (in 100% Methanol) geblichen und in einer absteigenden Methanolreihe (je 10min: 75%, 50%, 25% Methanol) rehydriert. Nach 8-minütiger Inkubation in 0.2MHCl (RT) wurden die Embryonen 3x 10min mit PBST (PBS+0.1%Tween) gewaschen, für 12min mit 4.5µg/ml Proteinase K in PBST bei RT inkubiert und danach für 10min in 2mg/ml Glycin/PBST gewaschen. Die Embryonen wurden 3x für 5min in PBST gespült, in 4%PFA/0.2%Glutaraldehyd bei RT nachfixiert und drei weitere Waschungen in PBST vorgenommen. Embryonen wurden im Anschluss für 3h in Hybridisierungslösung [50%Formamid, 5xSSC pH5.0, 5%Böhringer Block, 10% Dextransulfat, 5mM EDTA, 0.1% Tween, 10µg/ml tRNA (Sigma), 10µg/ml ssDNA, 40µg/ml Heparin] bei 70°C präinkubiert und danach DIG-markierte RNA-Sonden zu dem Embryonenhybridisierungsmix gegeben. Das Gemisch aus Embryo und DIG-RNA-Sonde in Hybridisierungslösung wurde über Nacht bei 70°C leicht schüttelnd inkubiert.

Am zweiten Tag der Behandlung wurden Embryonen zweimal 30min bei 70°C in Lösung1 gewaschen (50%Formamid, 5xSSC pH7, 0.1%Tween), gefolgt von einem 10minütigen Waschschrift in einer 1:1 Mischung aus Lösung1 und Lösung2 (0.5MNaCl, 10mM Tris pH7.4, 0.1%Tween) bei 70°C und drei 5-minütigen Waschgängen in Lösung2 (RT). Durch eine 15minütige Behandlung mit 50µg/ml RNase A (Böhringer, Mannheim) in Lösung2 (schüttelnd bei 37°C) wurden nicht gebundene RNAs abgebaut. Danach folgten drei je

einstündige Waschgänge in Lösung³ (50%Formamid, 2xSSC pH7.0, 0.1%Tween) bei 65°C. Die Embryonen wurden bei RT für je 5min zweimal mit TBS (+0.2%Tween) und einmal mit PBS (+0.2%Tween) gewaschen, bevor sie in 1%Böhringer-Block (mit 10% Sheepserum, 0.2% Tween) für 1h bei 4°C blockiert wurden. Gegen unspezifische Antikörper-/Hintergrundfärbung wurde die DIG-Antikörper-Blockierungslösung zeitlich parallel zur Embryonenbehandlung für 3h mit Embryonenpuder (s.u.) inkubiert. Die DIG-Antikörper-Blockierungslösung wurde über Nacht auf die Embryonen gegeben und diese bei 4°C wippend inkubiert.

Der dritte Tag der In-Situ-Hybridisierung bedarf einer Folge von drei 5-minütigen und sechs einstündigen Waschschritten in TBS (+0.2% Tween, +0.1% BSA) (RT). Über Nacht wurden die Embryonen erneut bei 4°C in dieser Waschlösung gespült. Am vierten Tag wurden die Embryonen zweimal je 1h in AP-Puffer gewaschen (100mM Tris pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween) und danach in BM Purple (Roche) für 4h-2Tage bei RT gefärbt und Fotos gemacht. Embryonen wurden nach Fotografie [StemiSV11 (Apo), Zeiss] für zwei weitere Tage in BM Purple überfärbt und danach in Plastik eingebettet sowie geschnitten (s. vorherige Kapitel).

Embryonenpuder, welcher in In-Situ-Hybridisierungen am ganzen Embryo zur Reduktion unspezifischer Antikörperfärbung eingesetzt wurde, wurde aus Embryonen (E11.5-E13.5) gewonnen. Dafür wurden die Embryonen in einem Volumen (1V= 1ml/g) PBS aufgenommen und homogenisiert. Nach Zusatz von 4V kaltem Aceton und 30min rotierender Inkubation bei 4°C wurde die Zellmasse für 10min bei 4°C und 7.700 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im selben Volumen resuspendiert, 10min auf Eis inkubiert und anschließend für 10min bei 4°C und 7.700 rpm abzentrifugiert. Nach der Lufttrocknung des Pellets auf Filterpapier wurde dieses zerkleinert und bei -20°C bis zum Gebrauch eingelagert. Vor dem Gebrauch wurde eine Spatelspitze des Embryonenpuders zur Hitzeinaktivierung endogener alkalischer Phosphatase in 2ml TBST aufgenommen und für 30min bei 70°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5min bei 4°C und 5000 rpm konnte das Pellet im Antikörper-Böhringer-Blockierungsmix [10%Böhringer Block (Roche), 10% Sheepserum, 1:4000 anti-DIG-Fab gekoppelt an alkalische Phosphatase in PBS (+0.2%Tween)] gelöst, bei 4°C 2-4h rotierend inkubiert, danach für 10min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand über Nacht auf die Embryonen gegeben werden.

β -Galaktosidasefärbung am ganzen Embryo

Für β -Galaktosidasefärbungen am ganzen Embryo wurden Embryonen aus den Verpaarungen von Z/AP-Indikator- mit MesP1-cre-Mäusen verwendet (E7.5-E9.5). Dafür wurden die Embryonen in kaltem PBS präpariert und für 15min fixiert (23mM NaH₂PO₄, 77mM Na₂HPO₄, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 0.2%Glutaraldehyd, 0.02% Nonidet-P40, 0.01% Natriumoxycholat). Nach kurzer Spülung der Embryonen in PBS wurden die Embryonen für 30min bei 70°C in PBS zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatase inkubiert und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Nach 10minütiger Inkubation in AP-Puffer (100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂) wurden die Embryonen durch Umsetzung des Substrates für alkalische Phosphatase, BM Purple (Roche, Verwendung des Überstandes nach 5min Zentrifugation bei RT und 3500rpm) in den Zellen blau gefärbt, in denen MesP1-cre exprimiert wurde, und Fotos [StemiSV11 (Apo), Zeiss] wurden gemacht.

Abkürzungsverzeichnis

anterior	nach vorn gerichtet
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
caudal	schwanzwärts gerichtet
cranial	hirnwärts gerichtet
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Didesoxyribonukleinsäure
dorsal	nach dem Rücken gerichtet
E	Embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FHF	erstes Herzfeld (<u>f</u> irst <u>h</u> eart <u>f</u> ield)
h	Stunde(n)
IFT	Einflusstrakt (<u>i</u> n <u>f</u> low <u>t</u> ract)
M	mol/L
min	Minute(n)
Morphogenese	Gestaltbildung
NCC	Neuralleistenzellen (<u>n</u> eural <u>c</u> rest <u>c</u> ells)
OFT	Ausflusstrakt (<u>o</u> ut <u>f</u> low <u>t</u> ract)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pHH3	phospho Histon H3
PBS	phosphate buffered saline
posterior	nach hinten gerichtet
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sagital	vertikal/ senkrecht
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SHF	zweites Herzfeld (second heart field)
TNB	Tris-Natrium-Puffer
transversal	horizontal/ Quer (-schnitt)
ventral	nach dem Bauch gerichtet
μ	mikro (10^{-6})

Literaturverzeichnis

1. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. [1982;31:99-109.](#)
2. Sharma RP. Wingless, a new mutant in *D. melanogaster*. *Dros Inf Service*. [1973;50:134.](#)
3. Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG, Lawrence PA. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell*. [1987;50:659-663.](#)
4. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. [1987;50:649-657.](#)
5. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. A new nomenclature for *int-1* and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. [1991;64:231.](#)
6. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. [1980;287:795-801.](#)
7. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Archives of Developmental Biology*. [1984;193:267-282.](#)
8. Perrimon N, Mahowald AP. Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol*. [1987;119:587-600.](#)
9. Perrimon N, Engstrom L, Mahowald AP. Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. *Genetics*. [1989;121:333-352.](#)
10. Spemann H, Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux Arch Entw Mech Org*. [1924;100:599-638.](#)
11. Morgan TH. The relation between normal and abnormal development of the embryo of the frog, as determined by the effect of lithium chloride in solution. *Archiv für Entwicklungsmechanik*. [1902;XVI:691-716.](#)
12. McMahon AP, Moon RT. Ectopic expression of the proto-oncogene *int-1* in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*. [1989;58:1075-1084.](#)
13. Glinka A, Delius H, Blumenstock C, Niehrs C. Combinatorial signalling by *Xwnt-11* and *Xnr3* in the organizer epithelium. *Mech Dev*. [1996;60:221-231.](#)
14. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [1996;93:8455-8459.](#)
15. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. [1997;11:3286-3305.](#)

16. Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* [1996;10:3116-3128.](#)
17. Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* [2002;277:12816-12823.](#)
18. Banziger C, Soldini D, Schutt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell.* [2006;125:509-522.](#)
19. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell.* [2006;125:523-533.](#)
20. Coudreuse DY, Roel G, Betist MC, Destree O, Korswagen HC. Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science.* [2006;312:921-924.](#)
21. Goodman RM, Thombre S, Firtina Z, Gray D, Betts D, Roebuck J, Spana EP, Selva EM. Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development.* [2006;133:4901-4911.](#)
22. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene.* [2006;25:7461-7468.](#)
23. Prasad BC, Clark SG. Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development.* [2006;133:1757-1766.](#)
24. Hausmann G, Banziger C, Basler K. Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat Rev Mol Cell Biol.* [2007;8:331-336.](#)
25. Eaton S. Retromer retrieves wntless. *Dev Cell.* [2008;14:4-6.](#)
26. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* [1996;382:225-230.](#)
27. Gomperts SN. Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell.* [1996;84:659-662.](#)
28. Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem.* [1996;271:4468-4476.](#)
29. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* [2003;5:367-377.](#)
30. Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet.* [2007;8:126-138.](#)

31. [Riggleman B, Schedl P, Wieschaus E. Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. Cell. 1990;63:549-560.](#)
32. [Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends Genet. 1993;9:317-321.](#)
33. [Oda H, Uemura T, Shiomi K, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Identification of a Drosophila homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. J Cell Biol. 1993;121:1133-1140.](#)
34. [Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J Cell Biol. 1994;127:2061-2069.](#)
35. [Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature. 1996;382:638-642.](#)
36. [Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech Dev. 1996;59:3-10.](#)
37. [Molenaar M, van de WM, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell. 1996;86:391-399.](#)
38. [Peifer M, Sweeton D, Casey M, Wieschaus E. wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. Development. 1994;120:369-380.](#)
39. [van Leeuwen F, Samos CH, Nusse R. Biological activity of soluble wingless protein in cultured Drosophila imaginal disc cells. Nature. 1994;368:342-344.](#)
40. [Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli \(APC\) tumor-suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:3046-3050.](#)
41. [Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science. 1998;280:596-599.](#)
42. [Hart MJ, de los SR, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. Curr Biol. 1998;8:573-581.](#)
43. [Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. Axis determination in Xenopus involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. Curr Biol. 1998;8:591-594.](#)
44. [Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM. Casein kinase I transduces Wnt signals. Nature. 1999;401:345-350.](#)
45. [Sakanaka C, Leong P, Xu L, Harrison SD, Williams LT. Casein kinase Iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:12548-12552.](#)

46. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben Shushan E, Mann M, Ben Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* [2002;16:1066-1076.](#)
47. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* [2002;108:837-847.](#)
48. Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* [2002;21:1733-1742.](#)
49. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* [1997;16:3797-3804.](#)
50. Salomon D, Sacco PA, Roy SG, Simcha I, Johnson KR, Wheelock MJ, Ben Ze'ev A. Regulation of beta-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *J Cell Biol.* [1997;139:1325-1335.](#)
51. Jiang J, Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature.* [1998;391:493-496.](#)
52. Marikawa Y, Elinson RP. beta-TrCP is a negative regulator of Wnt/beta-catenin signaling pathway and dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* [1998;77:75-80.](#)
53. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature.* [1998;395:604-608.](#)
54. Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, Paroush Z, Groner Y. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [1998;95:11590-11595.](#)
55. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de WM, Destree O, Clevers H. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature.* [1998;395:608-612.](#)
56. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.* [2000;407:535-538.](#)
57. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* [2000;407:530-535.](#)
58. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature.* [2000;407:527-530.](#)
59. Finch PW, He X, Kelley MJ, Uren A, Schaudies RP, Popescu NC, Rudikoff S, Aaronson SA, Varmus HE, Rubin JS. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [1997;94:6770-6775.](#)

60. Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*. [1997;88:747-756](#).
61. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*. [1999;398:431-436](#).
62. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. [1998;391:357-362](#).
63. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. [2002;417:664-667](#).
64. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*. [2005;438:867-872](#).
65. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. [2005;438:873-877](#).
66. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*. [2007;316:1619-1622](#).
67. Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJ, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol*. [2007;14:484-492](#).
68. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, III, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*. [2001;7:801-809](#).
69. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J*. [2000;19:1839-1850](#).
70. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Zullig S, Basler K. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*. [2002;109:47-60](#).
71. Parker DS, Jemison J, Cadigan KM. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development*. [2002;129:2565-2576](#).
72. Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M. A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol*. [2002;4:367-373](#).
73. Wolf D, Rodova M, Miska EA, Calvet JP, Kouzarides T. Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J Biol Chem*. [2002;277:25562-25567](#).

74. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* [2004;18:2225-2230.](#)
75. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* [2005;12:364-371.](#)
76. Riese J, Yu X, Munnerlyn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell.* [1997;88:777-787.](#)
77. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* [1998;281:1509-1512.](#)
78. Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* [1995;121:3529-3537.](#)
79. Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* [2000;148:567-578.](#)
80. Marikawa Y. Wnt/beta-catenin signaling and body plan formation in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol.* [2006;17:175-184.](#)
81. Kimura-Yoshida C, Nakano H, Okamura D, Nakao K, Yonemura S, Belo JA, Aizawa S, Matsui Y, Matsuo I. Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Dev Cell.* [2005;9:639-650.](#)
82. Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet.* [1999;22:361-365.](#)
83. Hsieh JC, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, Wines ME, Rosenquist T, Holdener BC. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell.* [2003;112:355-367.](#)
84. Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development.* [2004;131:2803-2815.](#)
85. Kemler R, Hierholzer A, Kanzler B, Kuppig S, Hansen K, Taketo MM, de Vries WN, Knowles BB, Solter D. Stabilization of beta-catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development.* [2004;131:5817-5824.](#)
86. Chazaud C, Rossant J. Disruption of early proximodistal patterning and AVE formation in Apc mutants. *Development.* [2006;133:3379-3387.](#)
87. Lane TF, Leder P. Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice. *Oncogene.* [1997;15:2133-2144.](#)
88. Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell.* [1988;55:619-625.](#)

89. Miyoshi K, Rosner A, Nozawa M, Byrd C, Morgan F, Landesman-Bollag E, Xu X, Seldin DC, Schmidt EV, Taketo MM, Robinson GW, Cardiff RD, Hennighausen L. Activation of different Wnt/beta-catenin signaling components in mammary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene*. [2002;21:5548-5556](#).
90. Mucenski ML, Wert SE, Nation JM, Loudy DE, Huelsken J, Birchmeier W, Morrissey EE, Whitsett JA. beta-Catenin is required for specification of proximal/distal cell fate during lung morphogenesis. *J Biol Chem*. [2003;278:40231-40238](#).
91. Mucenski ML, Nation JM, Thitoff AR, Besnard V, Xu Y, Wert SE, Harada N, Taketo MM, Stahlman MT, Whitsett JA. Beta-catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. [2005;289:L971-L979](#).
92. Shu W, Guttentag S, Wang Z, Andl T, Ballard P, Lu MM, Piccolo S, Birchmeier W, Whitsett JA, Millar SE, Morrissey EE. Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung. *Dev Biol*. [2005;283:226-239](#).
93. Park JS, Valerius MT, McMahon AP. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development*. [2007;134:2533-2539](#).
94. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: loss- and gain-of-function mutations of beta catenin in mice. *Genes Dev*. [2008;22:2308-2341](#).
95. Kim BM, Buchner G, Miletich I, Sharpe PT, Shivdasani RA. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev Cell*. [2005;8:611-622](#).
96. Kim BM, Miletich I, Mao J, McMahon AP, Sharpe PA, Shivdasani RA. Independent functions and mechanisms for homeobox gene Barx1 in patterning mouse stomach and spleen. *Development*. [2007;134:3603-3613](#).
97. Aulehla A, Wiegraebe W, Baubet V, Wahl MB, Deng C, Taketo M, Lewandoski M, Pourquie O. A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nat Cell Biol*. [2008;10:186-193](#).
98. Dunty WC, Jr., Biris KK, Chalamalasetty RB, Taketo MM, Lewandoski M, Yamaguchi TP. Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. *Development*. [2008;135:85-94](#).
99. McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*. [1990;62:1073-1085](#).
100. Thomas KR, Capecchi MR. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*. [1990;346:847-850](#).
101. Popperl H, Schmidt C, Wilson V, Hume CR, Dodd J, Krumlauf R, Beddington RS. Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development*. [1997;124:2997-3005](#).

102. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Belmonte JC, Westphal H. *Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. [2001;1:423-434](#).
103. Wang Y, Huso D, Cahill H, Ryugo D, Nathans J. Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the *frizzled-4* gene. *J Neurosci*. [2001;21:4761-4771](#).
104. Niswander L. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet*. [2003;4:133-143](#).
105. Soshnikova N, Zechner D, Huelsken J, Mishina Y, Behringer RR, Taketo MM, Crenshaw EB, III, Birchmeier W. Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev*. [2003;17:1963-1968](#).
106. Barrow JR, Thomas KR, Boussadia-Zahui O, Moore R, Kemler R, Capecchi MR, McMahon AP. Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev*. [2003;17:394-409](#).
107. Ahn K, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR, Crenshaw EB, III. BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development*. [2001;128:4449-4461](#).
108. Dequeant ML, Pourquie O. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat Rev Genet*. [2008;9:370-382](#).
109. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. [2001;105:533-545](#).
110. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, Huelsken J. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. [2008;452:650-653](#).
111. Kobieliak K, Stokes N, de la CJ, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:10063-10068](#).
112. Plikus MV, Mayer JA, de la CD, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature*. [2008;451:340-344](#).
113. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*. [1998;19:379-383](#).
114. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. [2003;423:409-414](#).
115. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, III, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. [2003;423:448-452](#).

116. Haramis AP, Begthel H, van den BM, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*. [2004;303:1684-1686](#).
117. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet*. [2004;36:1117-1121](#).
118. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den BM, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. [2005;435:959-963](#).
119. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. [2006;127:469-480](#).
120. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. [2006;7:1048-1056](#).
121. Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol*. [2006;7:1037-1047](#).
122. Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, III, Birchmeier W, Birchmeier C. beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol*. [2003;258:406-418](#).
123. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*. [2005;8:727-738](#).
124. Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Krones A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R, Grosschedl R, Rose D, Li X, Rosenfeld MG. Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell*. [2006;125:593-605](#).
125. Zechner D, Muller T, Wende H, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, III, Treier M, Birchmeier W, Birchmeier C. Bmp and Wnt/beta-catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons. *Dev Biol*. [2007;303:181-190](#).
126. Muller T, Anlag K, Wildner H, Britsch S, Treier M, Birchmeier C. The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord. *Genes Dev*. [2005;19:733-743](#).
127. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. [2007;8:970-982](#).
128. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. [1995;270:10618-10624](#).
129. Constam DB, Robertson EJ. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol*. [1999;144:139-149](#).

130. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. [1994;370:341-347.](#)
131. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. [2005;19:2783-2810.](#)
132. Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol*. [1994;14:3810-3821.](#)
133. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*. [1996;85:489-500.](#)
134. Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*. [1996;87:1215-1224.](#)
135. Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*. [1996;383:168-172.](#)
136. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*. [1998;273:1872-1879.](#)
137. Kawai S, Faucheu C, Gallea S, Spinella-Jaegle S, Atfi A, Baron R, Roman SR. Mouse smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. [2000;271:682-687.](#)
138. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett*. [2003;546:133-139.](#)
139. Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell*. [1996;86:435-444.](#)
140. Chen YG, Liu F, Massague J. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J*. [1997;16:3866-3876.](#)
141. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. [2003;113:685-700.](#)
142. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev*. [1997;11:984-995.](#)
143. Massague J. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*. [1996;85:947-950.](#)
144. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. [1997;390:465-471.](#)
145. Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, De Caestecker M, Lin K. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell*. [2004;15:813-823.](#)

146. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massague J. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. [1996;381:620-623.](#)
147. Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev*. [1998;12:2153-2163.](#)
148. Janknecht R, Wells NJ, Hunter T. TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev*. [1998;12:2114-2119.](#)
149. Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*. [2000;100:229-240.](#)
150. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*. [1995;270:2008-2011.](#)
151. Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*. [1999;18:179-187.](#)
152. Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*. [2007;131:980-993.](#)
153. Zeng YA, Rahnama M, Wang S, Sosu-Sedzorme W, Verheyen EM. Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. *Development*. [2007;134:2061-2071.](#)
154. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. [1999;399:798-802.](#)
155. Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*. [1996;86:589-598.](#)
156. Zimmerman LB, Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. [1996;86:599-606.](#)
157. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*. [1998;1:673-683.](#)
158. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell*. [2004;7:719-730.](#)
159. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*. [1999;401:480-485.](#)

160. Grotewold L, Plum M, Dildrop R, Peters T, Ruther U. Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* [2001;100:327-330.](#)
161. Souchehnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Moren A, Heldin CH, Christian JL, ten Dijke P. Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem.* [1998;273:25364-25370.](#)
162. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* [1998;12:186-197.](#)
163. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2001;98:974-979.](#)
164. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* [2003;14:2809-2817.](#)
165. van Wijk B, Moorman AF, van den Hoff MJ. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res.* [2006;74:244-255.](#)
166. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* [1965;150:893-899.](#)
167. Urist MR. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res.* [1997;12:343-346.](#)
168. GREEN MC. Effects of the short ear gene in the mouse on cartilage formation in healing bone fractures. *J Exp Zool.* [1958;137:75-88.](#)
169. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland NG, Jenkins NA. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell.* [1992;71:399-410.](#)
170. King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol.* [1994;166:112-122.](#)
171. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* [2006;16:151-158.](#)
172. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* [1998;280:1455-1457.](#)
173. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet.* [1998;22:321-339.](#)
174. Baur ST, Mai JJ, Dymecki SM. Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development.* [2000;127:605-619.](#)
175. Yi SE, Daluiski A, Pederson R, Rosen V, Lyons KM. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development.* [2000;127:621-630.](#)
176. Zou H, Wieser R, Massague J, Niswander L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* [1997;11:2191-2203.](#)

177. [Mishina Y](#). Function of bone morphogenetic protein signaling during mouse development. *Front Biosci*. [2003](#);8:d855-d869.
178. [Goumans MJ](#), [Mummery C](#). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol*. [2000](#);44:253-265.
179. [Kishigami S](#), [Mishina Y](#). BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. [2005](#);16:265-278.
180. [Mishina Y](#), [Suzuki A](#), [Ueno N](#), [Behringer RR](#). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*. [1995](#);9:3027-3037.
181. [Winnier G](#), [Blessing M](#), [Labosky PA](#), [Hogan BL](#). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. [1995](#);9:2105-2116.
182. [Mishina Y](#), [Crombie R](#), [Bradley A](#), [Behringer RR](#). Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis. *Dev Biol*. [1999](#);213:314-326.
183. [Beppu H](#), [Kawabata M](#), [Hamamoto T](#), [Chytil A](#), [Minowa O](#), [Noda T](#), [Miyazono K](#). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol*. [2000](#);221:249-258.
184. [Lechleider RJ](#), [Ryan JL](#), [Garrett L](#), [Eng C](#), [Deng C](#), [Wynshaw-Boris A](#), [Roberts AB](#). Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol*. [2001](#);240:157-167.
185. [Tremblay KD](#), [Dunn NR](#), [Robertson EJ](#). Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development*. [2001](#);128:3609-3621.
186. [Nagy A](#), [Rossant J](#), [Nagy R](#), [Abramow-Newerly W](#), [Roder JC](#). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [1993](#);90:8424-8428.
187. [Lawson KA](#), [Dunn NR](#), [Roelen BA](#), [Zeinstra LM](#), [Davis AM](#), [Wright CV](#), [Korving JP](#), [Hogan BL](#). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. [1999](#);13:424-436.
188. [Miura S](#), [Tallquist MD](#), [Soriano P](#), [Mishina Y](#). BMP signaling is important for mesoderm induction and germ layer development in mouse embryogenesis. *Dev Biol*. [2002](#);247:505.
189. [Lee KJ](#), [Mendelsohn M](#), [Jessell TM](#). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev*. [1998](#);12:3394-3407.
190. [Bermingham NA](#), [Hassan BA](#), [Wang VY](#), [Fernandez M](#), [Banfi S](#), [Bellen HJ](#), [Fritzsche B](#), [Zoghbi HY](#). Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron*. [2001](#);30:411-422.

191. Wine-Lee L, Ahn KJ, Richardson RD, Mishina Y, Lyons KM, Crenshaw EB, III. Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development*. [2004;131:5393-5403](#).
192. Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev*. [2001;15:2094-2110](#).
193. Wagner TU. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences. *FEBS J*. [2007;274:2968-2976](#).
194. Sousa Lopes SM, Roelen BA, Monteiro RM, Emmens R, Lin HY, Li E, Lawson KA, Mummery CL. BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. [2004;18:1838-1849](#).
195. Arnold SJ, Maretto S, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev Biol*. [2006;296:104-118](#).
196. Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A. The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*. [1994;372:684-686](#).
197. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. [1996;10:1580-1594](#).
198. Fogarty MP, Kessler JD, Wechsler-Reya RJ. Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J Neurobiol*. [2005;64:458-475](#).
199. Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*. [2005;6:945-954](#).
200. Mishra L, Derynck R, Mishra B. Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science*. [2005;310:68-71](#).
201. Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*. [1996;17:595-606](#).
202. Mehler MF, Mabie PC, Zhu G, Gokhan S, Kessler JA. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev Neurosci*. [2000;22:74-85](#).
203. Gomes WA, Mehler MF, Kessler JA. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol*. [2003;255:164-177](#).
204. Anderson RM, Lawrence AR, Stottmann RW, Bachiller D, Klingensmith J. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development*. [2002;129:4975-4987](#).
205. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. [2005;6:826-835](#).

206. Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*. [2007;134:1023-1034](#).
207. Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet*. [2007;8:368-381](#).
208. Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*. [1999;126:3437-3447](#).
209. Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. [2000;10:345-352](#).
210. Kinder SJ, Loebel DA, Tam PP. Allocation and early differentiation of cardiovascular progenitors in the mouse embryo. *Trends Cardiovasc Med*. [2001;11:177-184](#).
211. Yamaguchi TP. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol*. [2001;11:R713-R724](#).
212. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. [2001;1:435-440](#).
213. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol*. [2001;238:97-109](#).
214. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. [2001;128:3179-3188](#).
215. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. [2003;5:877-889](#).
216. Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. [2004;131:3931-3942](#).
217. Meilhac SM, Esner M, Kerszberg M, Moss JE, Buckingham ME. Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis. *J Cell Biol*. [2004;164:97-109](#).
218. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*. [2004;95:261-268](#).
219. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet*. [2002;3:103-113](#).
220. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*. [1998;95:829-837](#).

221. Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*. [2002;418:96-99.](#)
222. Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte JC, Hirokawa N. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell*. [2005;121:633-644.](#)
223. Shiratori H, Hamada H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development*. [2006;133:2095-2104.](#)
224. Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CV, Potter SS, Overbeek P, Kuehn MR. Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature*. [1996;381:158-161.](#)
225. Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H. Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature*. [1996;381:151-155.](#)
226. Yoshioka H, Meno C, Koshiba K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC, Hamada H, Noji S. Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*. [1998;94:299-305.](#)
227. Adachi H, Saijoh Y, Mochida K, Ohishi S, Hashiguchi H, Hirao A, Hamada H. Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev*. [1999;13:1589-1600.](#)
228. Saijoh Y, Adachi H, Mochida K, Ohishi S, Hirao A, Hamada H. Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2. *Genes Dev*. [1999;13:259-269.](#)
229. Norris DP, Robertson EJ. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev*. [1999;13:1575-1588.](#)
230. Saijoh Y, Adachi H, Sakuma R, Yeo CY, Yashiro K, Watanabe M, Hashiguchi H, Mochida K, Ohishi S, Kawabata M, Miyazono K, Whitman M, Hamada H. Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2. *Mol Cell*. [2000;5:35-47.](#)
231. Shiratori H, Sakuma R, Watanabe M, Hashiguchi H, Mochida K, Sakai Y, Nishino J, Saijoh Y, Whitman M, Hamada H. Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell*. [2001;7:137-149.](#)
232. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S, Noji S, Kondoh H, Hamada H. lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*. [1998;94:287-297.](#)
233. Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, van Bebber F, Lowe LA, Nowotschin S, Viebahn C, Haffter P, Kuehn MR, Blum M. The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*. [1999;126:1225-1234.](#)

234. Ramsdell AF. Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination. *Dev Biol.* [2005;288:1-20.](#)
235. Stoller JZ, Epstein JA. Cardiac neural crest. *Semin Cell Dev Biol.* [2005;16:704-715.](#)
236. Waldo KL, Hutson MR, Ward CC, Zdanowicz M, Stadt HA, Kumiski D, Abu-Issa R, Kirby ML. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. *Dev Biol.* [2005;281:78-90.](#)
237. Waldo KL, Hutson MR, Stadt HA, Zdanowicz M, Zdanowicz J, Kirby ML. Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. *Dev Biol.* [2005;281:66-77.](#)
238. Hiruma T, Nakajima Y, Nakamura H. Development of pharyngeal arch arteries in early mouse embryo. *J Anat.* [2002;201:15-29.](#)
239. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* [2003;9:653-660.](#)
240. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* [2003;9:685-693.](#)
241. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol.* [2005;170:1135-1146.](#)
242. Brown CB, Baldwin HS. Neural crest contribution to the cardiovascular system. *Adv Exp Med Biol.* [2006;589:134-154.](#)
243. Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell.* [2006;127:1151-1165.](#)
244. Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell.* [2008;2:320-331.](#)
245. Yashiro K, Shiratori H, Hamada H. Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch. *Nature.* [2007;450:285-288.](#)
246. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science.* [2006;313:1922-1927.](#)
247. Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet.* [2002;3:544-556.](#)
248. Srivastava D. Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis. *Cell.* [2006;126:1037-1048.](#)
249. Brown CO, III, Chi X, Garcia-Gras E, Shirai M, Feng XH, Schwartz RJ. The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer. *J Biol Chem.* [2004;279:10659-10669.](#)
250. Lee KH, Evans S, Ruan TY, Lassar AB. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development.* [2004;131:4709-4723.](#)

251. Peterkin T, Gibson A, Loose M, Patient R. The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol.* [2005;16:83-94.](#)
252. Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development.* [2005;132:3405-3417.](#)
253. Nguyen-Tran VTB, Chen J, Ruiz-Lozano P, Chien KR. The MLC-2 Paradigm for Ventricular Heart Chamber Specification, Maturation, and Morphogenesis. In: *Heart Development.* [1999.](#) Academic Press.
254. Biben C, Harvey RP. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* [1997;11:1357-1369.](#)
255. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.* [1997;16:154-160.](#)
256. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell.* [2001;106:709-721.](#)
257. Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development.* [2002;129:4613-4625.](#)
258. Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, Chen Z, Yang Z, Schneider MD, Chien KR, Conway SJ, Yoder MC, Haneline LS, Franco D, Shou W. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development.* [2004;131:2219-2231.](#)
259. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science.* [1999;283:1161-1164.](#)
260. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* [1999;211:100-108.](#)
261. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet.* [2001;28:276-280.](#)
262. Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol.* [2006;68:97-121.](#)
263. Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H, Shou W, Ballestar E, Esteller M, Rojas A, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell.* [2007;12:415-429.](#)
264. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science.* [1997;276:1404-1407.](#)

265. McFadden DG, Charite J, Richardson JA, Srivastava D, Firulli AB, Olson EN. A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development*. [2000;127:5331-5341](#).
266. Vitelli F, Taddei I, Morishima M, Meyers EN, Lindsay EA, Baldini A. A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling. *Development*. [2002;129:4605-4611](#).
267. Hu T, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development*. [2004;131:5491-5502](#).
268. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development*. [2004;131:3217-3227](#).
269. Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriyia IS, Yamagishi H, Srivastava D. Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol*. [2001;235:62-73](#).
270. Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev*. [2003;17:269-281](#).
271. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*. [2002;111:673-685](#).
272. Nowotschin S, Liao J, Gage PJ, Epstein JA, Campione M, Morrow BE. Tbx1 affects asymmetric cardiac morphogenesis by regulating Pitx2 in the secondary heart field. *Development*. [2006;133:1565-1573](#).
273. Staehling-Hampton K, Hoffmann FM, Baylies MK, Rushton E, Bate M. dpp induces mesodermal gene expression in Drosophila. *Nature*. [1994;372:783-786](#).
274. Frasch M. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early Drosophila embryo. *Nature*. [1995;374:464-467](#).
275. Spencer FA, Hoffmann FM, Gelbart WM. Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in Drosophila melanogaster. *Cell*. [1982;28:451-461](#).
276. Bodmer R, Frasch M. Genetic Dissection of Heart Development. In: *Heart Development*. [1999](#). Academic Press.
277. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev*. [1997;11:451-462](#).
278. Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol*. [2000;224:226-237](#).

279. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* [2001;15:316-327.](#)
280. Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* [2001;15:304-315.](#)
281. Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev.* [2001;15:255-260.](#)
282. Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* [1998;12:107-119.](#)
283. Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development.* [1996;122:2977-2986.](#)
284. Dudley AT, Robertson EJ. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn.* [1997;208:349-362.](#)
285. Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in *Bmp5*; *Bmp7* double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development.* [1999;126:1753-1768.](#)
286. Kim RY, Robertson EJ, Solloway MJ. *Bmp6* and *Bmp7* are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Dev Biol.* [2001;235:449-466.](#)
287. Gaussin V, Van de PT, Mishina Y, Hanks MC, Zwijsen A, Huylebroeck D, Behringer RR, Schneider MD. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2002;99:2878-2883.](#)
288. Jiao K, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL. An essential role of *Bmp4* in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev.* [2003;17:2362-2367.](#)
289. Kaartinen V, Dudas M, Nagy A, Sridurongrit S, Lu MM, Epstein JA. Cardiac outflow tract defects in mice lacking ALK2 in neural crest cells. *Development.* [2004;131:3481-3490.](#)
290. Liu W, Selever J, Wang D, Lu MF, Moses KA, Schwartz RJ, Martin JF. *Bmp4* signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2004;101:4489-4494.](#)
291. Stottmann RW, Choi M, Mishina Y, Meyers EN, Klingensmith J. BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development.* [2004;131:2205-2218.](#)
292. Ma L, Lu MF, Schwartz RJ, Martin JF. *Bmp2* is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development.* [2005;132:5601-5611.](#)

293. Wang J, Sridurongrit S, Dudas M, Thomas P, Nagy A, Schneider MD, Epstein JA, Kaartinen V. Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Dev Biol.* [2005;286:299-310.](#)
294. Park C, Lavine K, Mishina Y, Deng CX, Ornitz DM, Choi K. Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. *Development.* [2006;133:3473-3484.](#)
295. Yang L, Cai CL, Lin L, Qyang Y, Chung C, Monteiro RM, Mummery CL, Fishman GI, Cogen A, Evans S. Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Development.* [2006;133:1575-1585.](#)
296. Jia Q, McDill BW, Li SZ, Deng C, Chang CP, Chen F. Smad signaling in the neural crest regulates cardiac outflow tract remodeling through cell autonomous and non-cell autonomous effects. *Dev Biol.* [2007;311:172-184.](#)
297. Song L, Fassler R, Mishina Y, Jiao K, Baldwin HS. Essential functions of Alk3 during AV cushion morphogenesis in mouse embryonic hearts. *Dev Biol.* [2007;301:276-286.](#)
298. Wu X, Golden K, Bodmer R. Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol.* [1995;169:619-628.](#)
299. Park M, Wu X, Golden K, Axelrod JD, Bodmer R. The wingless signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol.* [1996;177:104-116.](#)
300. Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [2003;100:5834-5839.](#)
301. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development.* [1996;122:3343-3353.](#)
302. Hoang BH, Thomas JT, Abdul-Karim FW, Correia KM, Conlon RA, Luyten FP, Ballock RT. Expression pattern of two Frizzled-related genes, Frzb-1 and Sfrp-1, during mouse embryogenesis suggests a role for modulating action of Wnt family members. *Dev Dyn.* [1998;212:364-372.](#)
303. Zakin LD, Mazan S, Maury M, Martin N, Guenet JL, Brulet P. Structure and expression of Wnt13, a novel mouse Wnt2 related gene. *Mech Dev.* [1998;73:107-116.](#)
304. Person AD, Garriock RJ, Krieg PA, Runyan RB, Klewer SE. Frzb modulates Wnt-9a-mediated beta-catenin signaling during avian atrioventricular cardiac cushion development. *Dev Biol.* [2005;278:35-48.](#)
305. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. *Dev Biol.* [2006;293:305-315.](#)
306. Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, Dejana E. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol.* [2004;166:359-367.](#)

307. Lickert H, Kutsch S, Kanzler B, Tamai Y, Taketo MM, Kemler R. Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell*. [2002;3:171-181](#).
308. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev*. [1995;9:1654-1666](#).
309. Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, Watanabe Y, Zaffran S, Bajolle F, Biben C, McBride JJ, Robertson BR, Chaulet H, Stennard FA, Wise N, Schaft D, Wolstein O, Furtado MB, Shiratori H, Chien KR, Hamada H, Black BL, Saga Y, Robertson EJ, Buckingham ME, Harvey RP. An *Nkx2-5/Bmp2/Smad1* negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*. [2007;128:947-959](#).
310. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. [1997;11:1048-1060](#).
311. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. [1997;11:1061-1072](#).
312. Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H, Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y, Kondo S, Yokoyama M. Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development*. [1999;126:5749-5758](#).
313. Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*. [1999;401:279-282](#).
314. Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet*. [2001;27:286-291](#).
315. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. [2001;104:619-629](#).
316. Choi M, Stottmann RW, Yang YP, Meyers EN, Klingensmith J. The bone morphogenetic protein antagonist noggin regulates mammalian cardiac morphogenesis. *Circ Res*. [2007;100:220-228](#).
317. Nakaya MA, Biris K, Tsukiyama T, Jaime S, Rawls JA, Yamaguchi TP. *Wnt3a* links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation. *Development*. [2005;132:5425-5436](#).
318. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. [2008;8:387-398](#).
319. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. [1999;398:422-426](#).

320. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de WM, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol.* [2002;22:1184-1193.](#)
321. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* [2002;22:1172-1183.](#)
322. Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, Kemler R, Gossler A, Kanzler B, Herrmann BG. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell.* [2003;4:395-406.](#)
323. Yu HM, Jerchow B, Sheu TJ, Liu B, Costantini F, Puzas JE, Birchmeier W, Hsu W. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development.* [2005;132:1995-2005.](#)
324. Oh KJ, Senzel L, Collier RJ, Finkelstein A. Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [1999;96:8467-8470.](#)
325. Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR. Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis.* [2002;32:69-72.](#)
326. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* [1999;18:5931-5942.](#)
327. Park EJ, Ogden LA, Talbot A, Evans S, Cai CL, Black BL, Frank DU, Moon AM. Required, tissue-specific roles for Egf8 in outflow tract formation and remodeling. *Development.* [2006;133:2419-2433.](#)
328. Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development.* [2006;133:1625-1634.](#)
329. Kokubo H, Tomita-Miyagawa S, Hamada Y, Saga Y. Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2. *Development.* [2007;134:747-755.](#)
330. Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A. Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol.* [1999;208:281-292.](#)
331. Lepore JJ, Mericko PA, Cheng L, Lu MM, Morrissey EE, Parmacek MS. GATA-6 regulates semaphorin 3C and is required in cardiac neural crest for cardiovascular morphogenesis. *J Clin Invest.* [2006;116:929-939.](#)
332. Kubalak SW, Miller-Hance WC, O'Brien TX, Dyson E, Chien KR. Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J Biol Chem.* [1994;269:16961-16970.](#)
333. Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodriguez-Rey JC, Ros MA. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell.* [1998;94:319-324.](#)

334. Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*. [2002;418:636-641](#).
335. Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2004;101:12573-12578](#).
336. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, Waldman T. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res*. [2002;62:2744-2748](#).
337. Tirosh-Finkel L, Elhanany H, Rinon A, Tzahor E. Mesoderm progenitor cells of common origin contribute to the head musculature and the cardiac outflow tract. *Development*. [2006;133:1943-1953](#).
338. Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest*. [1997;100:169-179](#).
339. Moses KA, DeMayo F, Braun RM, Reecy JL, Schwartz RJ. Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis*. [2001;31:176-180](#).
340. Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev*. [2000;91:259-270](#).
341. Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D. The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Dev Biol*. [2001;239:190-203](#).
342. Aubin J, Davy A, Soriano P. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev*. [2004;18:1482-1494](#).
343. Pajni-Underwood S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. [2007;134:2359-2368](#).
344. Kishigami S, Yoshikawa S, Castranio T, Okazaki K, Furuta Y, Mishina Y. BMP signaling through ACVRI is required for left-right patterning in the early mouse embryo. *Dev Biol*. [2004;276:185-193](#).
345. Liu Y, Asakura M, Inoue H, Nakamura T, Sano M, Niu Z, Chen M, Schwartz RJ, Schneider MD. Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:3859-3864](#).
346. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:9685-9690](#).
347. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2006;103:19812-19817](#).

348. Kwon C, Arnold J, Hsiao EC, Taketo MM, Conklin BR, Srivastava D. Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:10894-10899](#).
349. Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, Chen S, Xu H, Bu L, Jiang X, Lin L, Granger A, Moretti A, Caron L, Wu X, Clarke J, Taketo MM, Laugwitz KL, Moon RT, Gruber P, Evans SM, Ding S, Chien KR. The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell*. [2007;1:165-179](#).
350. Foley AC, Mercola M. Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev*. [2005;19:387-396](#).
351. Vijayaragavan K, Bhatia M. Early cardiac development: a Wnt beat away. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:9549-9550](#).
352. Ai D, Fu X, Wang J, Lu MF, Chen L, Baldini A, Klein WH, Martin JF. Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:9319-9324](#).
353. Cohen ED, Wang Z, Lepore JJ, Lu MM, Taketo MM, Epstein DJ, Morrissey EE. Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. *J Clin Invest*. [2007;117:1794-1804](#).
354. Lin L, Cui L, Zhou W, Dufort D, Zhang X, Cai CL, Bu L, Yang L, Martin J, Kemler R, Rosenfeld MG, Chen J, Evans SM. Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [2007;104:9313-9318](#).
355. Zhou W, Lin L, Majumdar A, Li X, Zhang X, Liu W, Etheridge L, Shi Y, Martin J, Van d, V, Kaartinen V, Wynshaw-Boris A, McMahon AP, Rosenfeld MG, Evans SM. Modulation of morphogenesis by noncanonical Wnt signaling requires ATF/CREB family-mediated transcriptional activation of TGFbeta2. *Nat Genet*. [2007;39:1225-1234](#).
356. Tzahor E. Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter. *Dev Cell*. [2007;13:10-13](#).
357. Cohen ED, Tian Y, Morrissey EE. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*. [2008;135:789-798](#).
358. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [1999;96:5522-5527](#).
359. Lee HH, Frasch M. Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target sloppy paired. *Development*. [2000;127:5497-5508](#).
360. Goswami M, Uzgare AR, Sater AK. Regulation of MAP kinase by the BMP-4/TAK1 pathway in *Xenopus* ectoderm. *Dev Biol*. [2001;236:259-270](#).

361. Nohe A, Keating E, Underhill TM, Knaus P, Petersen NO. Effect of the distribution and clustering of the type I A BMP receptor (ALK3) with the type II BMP receptor on the activation of signalling pathways. *J Cell Sci.* [2003;116:3277-3284.](#)
362. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* [2004;68:320-344.](#)
363. Chen HB, Shen J, Ip YT, Xu L. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev.* [2006;20:648-653.](#)
364. Marguerie A, Bajolle F, Zaffran S, Brown NA, Dickson C, Buckingham ME, Kelly RG. Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice. *Cardiovasc Res.* [2006;71:50-60.](#)
365. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* [2008;451:943-948.](#)
366. Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, Moon RT. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development.* [2007;134:479-489.](#)
367. Sambrook EF, Fritsch EF, Maniatis E. Molecular cloning: a laboratory handbook. [1989.](#) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
368. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman IG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. [1987.](#) Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
369. Berger SL, Kimmel AR. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Methods in Enzymology.* [1987.](#) Academic press.
370. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* [1988;239:487-491.](#)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin den 28.05.2008

Alexandra Klaus

Publikationsliste

Große Teile dieser Arbeit sind in folgenden Zeitschriften publiziert:

Klaus, A.; Saga, Y; Taketo, M.M.; Tzahor, E; & Birchmeier, W. Distinct roles of Wnt/ β -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 18531-18536 (2007).

Klaus, A. & Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Rev. Cancer* **8**, 387-398 (2008).